

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

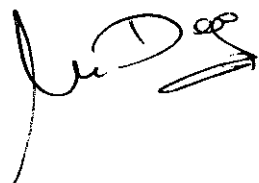
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

**CARACTERIZACIÓN
INMUNOBIOLOGICA DE LAS ESPECIES
QUÍSTICAS DE *TRICHINELLA***

Memoria presentada por M^º Auxiliadora Dea Ayuela para optar al grado de

Doctor en Farmacia

MADRID 1999

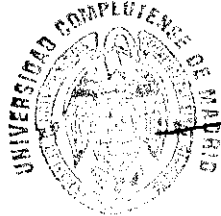
A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Dea Ayuela', located in the bottom right corner of the page.

Madrid, Febrero de 1999

DON ANTONIO R. MARTÍNEZ FERNÁNDEZ, CATEDRÁTICO Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.

CERTIFICA : Que la licenciada en Farmacia M^a Auxiliadora Dea Ayuela, ha realizado bajo la dirección del Prof. Dr. Francisco Bolás Fernández, en este Departamento de Parasitología, la Memoria titulada "CARACTERIZACIÓN INMUNOBIOLOGICA DE LAS ESPECIES QUÍSTICAS DE *TRICHINELLA*", para optar al grado de Doctor en Farmacia.

Y para que así conste, expido y firmo el presente certificado en Madrid, a veintiocho de Febrero de mil novecientos noventa y nueve.



FACULTAD DE FARMACIA
DPTO. DE PARASITOLOGIA

A handwritten signature in black ink, which appears to read "Antonio R. Martínez Fernández". The signature is written over a horizontal line and extends to the right.

I. INDICE	
II. INTRODUCCIÓN	2
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
III. MORFOLOGÍA Y CICLO BIOLÓGICO	5
3.1. Fase intestinal	5
3.2. Migración del embrión a su nicho	18
3.3. Fase muscular	19
IV. CICLOS EPIDEMIOLÓGICOS	25
4.1. Ciclo urbano o sinantrópico	25
4.2. Ciclo silvestre	28
4.2.1. Ciclo rural europeo	29
4.2.2. Ciclo silvestre africano	30
4.2.3. Ciclo silvestre nórdico	31
4.3. Circunstancias epidemiológicas especiales	33
4.4. Situación epidemiológica en la Unión Europea	34
V. ENCUADRE TAXONÓMICO	41
VI. RESPUESTA INMUNE	50
6.1. Antígenos	52
6.1.1. Antígenos de la cutícula	52
6.1.2. Antígenos de excreción/secreción	60
6.1.3. Antígenos somáticos	70
6.1.4. Glicoproteínas	77
6.2. Clasificación de antígenos y nomenclatura	88
6.2.1. Cronología de la respuesta inmune	89
6.2.2. Reconocimiento por distintos anticuerpos monoclonales y policlonales	90
6.3. Inmunidad natural o innata	93
6.4. Inmunidad adquirida	95
6.4.1. Respuesta celular	98
6.4.2. Respuesta humoral	124
VII. CRITERIOS DE ESPECIACIÓN	142
7.1. Criterios morfológicos	142
7.2. Criterios biológicos	143
7.2.1. Asentamiento intestinal	143
7.2.2. Distribución intestinal	150
7.2.3. Duración de la fase intestinal	154
7.2.4. Asentamiento muscular e ICR	158
7.2.5. Larviposición <i>in vitro</i>	165
7.3. Resistencia a la temperatura	168
7.3.1. Resistencia a la congelación	168
7.3.2. Resistencia a las altas temperaturas	173
7.4. Resistencia a antihelmínticos	174

7.5. Criterios genéticos	175
7.5.1. Pruebas de entrecruzamiento	175
7.5.2. Pruebas de ADN	176
7.5.2.1. ADN repetitivo y endonucleasas de restricción	176
7.5.2.2. Sondas específicas	176
7.5.2.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	178
7.5.2.4. Amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD–Random amplified polymorphic DNA)	178
7.6. Criterios bioquímicos	180
7.6.1. Estudios de isoenzimas	180
7.6.2. Estudio de proteínas	184
7.6.3. Estudio de proteasas	185
7.7. Criterios inmunológicos	187
7.7.1. Variabilidad antigénica en las especies de <i>Trichinella</i>	188
7.7.2. Respuesta inmune	192
VIII. OBJETIVOS	212
IX. MATERIALES Y REACTIVOS	216
9.1. Animales de experimentación	216
9.1.1. En pruebas biológicas	216
9.1.2. En pruebas inmunológicas	216
9.2. Aislamientos de <i>Trichinella</i>	216
9.3. Reactivos generales	220
9.4. Medios de cultivo	220
9.5. Reactivos de electroforesis	221
9.6. Técnica de tinción de proteínas	223
9.7. Reactivos de ELISA	223
9.8. Reactivos de western-blot	225
9.9. Tampones para detección de glicoproteínas	226
9.10. Material de laboratorio	227
9.11. Aparatos	229
MÉTODOS Y RESULTADOS I. ESTUDIOS BIOLÓGICOS	
X. ESTUDIO COMPARADO DE LA CAPACIDAD INFESTANTE DE LAS ESPECIES DE <i>TRICHINELLA</i>	231
10.1. Asentamiento muscular en ratón : Determinación de la capacidad reproductiva	231
10.1.1. Aislamientos de <i>Trichinella</i>	231
10.1.2. Obtención y recuento de larvas L1	231
10.1.3. Nivel de asentamiento muscular	234
10.1.4. Cálculo del Índice de Capacidad	236

Reproductiva (ICR)	
10.1.5. Análisis estadístico	237
10.1.5.1. Sobre la variable "número de larvas"	237
10.1.5.2. Sobre la variable ICR	245
10.2. Determinación del comportamiento intestinal en el ratón	249
10.2.1. Recuperación y recuento de adultos	249
10.2.2. Determinación de los niveles de asentamiento intestinal	250
10.2.2.1. Estudio estadístico	251
10.2.3. Distribución intestinal	252
10.2.3.1. Estudio estadístico	256
10.2.4. Dinámica de la fase intestinal	258
10.3. Prolificidad y ritmo de larviposición <i>in vitro</i>	261
10.3.1. Aislamiento e incubación <i>in vitro</i> de las hembras adultas	261
10.3.2. Recuento de embriones	262
10.3.3. Determinación del ritmo de larviposición <i>in vitro</i>	262
10.3.3.1. Estudio estadístico	266
MÉTODOS Y RESULTADOS II. ESTUDIOS BIOQUÍMICOS E INMUNOLÓGICOS	268
XI. ESTUDIO DEL PERFIL PROTEICO	270
11.1. Obtención del antígeno bruto larvario	270
11.2. Obtención del antígeno excretor-secretor larvario	271
11.3. Cálculo de la concentración proteica	272
11.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	273
11.4.1. Electroforesis en geles SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras	273
11.4.2. Electroforesis en geles SDS-PAGE bajo condiciones reductoras	275
11.5. Perfiles electroforéticos de los extractos brutos de distintos aislados de <i>Trichinella</i>	276
11.6. Perfiles electroforéticos de los productos de ES de distintos aislados de <i>Trichinella</i>	282
XII. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD PROTEÁSICA	284
12.1. Ensayos electroforéticos	284
12.1.1. Electroforesis en geles SDS-PAGE conteniendo sustratos proteicos	284
12.1.2. Actividad proteolítica de los productos de ES de distintos aislados de <i>Trichinella</i>	286

12.2. Ensayos colorimétricos	290
12.2.1. Ensayos de degradación de azocaseína	290
12.2.2. Determinación de la actividad proteolítica mediante ensayos de degradación de azocaseína en distintos aislados de <i>Trichinella</i>	291
12.2.3. Estudio estadístico	292
XIII. ESTUDIO DE LA RESPUESTA HUMORAL EN EL MODELO EXPERIMENTAL MURINO	295
13.1. Protocolos de inmunización e infestación	295
13.1.1. Protocolo de infestación	295
13.1.2. Protocolo de inmunización	296
13.1.2.1. Inmunización con extracto bruto larvario	296
13.1.2.2. Inmunización con antígenos de ES	296
13.2. Obtención de sueros	296
13.3. Determinación de los niveles de anticuerpos	297
13.4. Detección de antígenos por wester-blot	299
13.5. Dinámica inmune humoral en distintas especies de <i>Trichinella</i>	301
13.5.1. Respuesta de IgG1	303
13.5.1.1. Infestaciones	303
13.5.1.2. Inmunizaciones	309
13.5.2. Respuesta de IgG2a	318
13.5.2.1. Infestaciones	318
13.5.2.2. Inmunizaciones	321
13.5.3. Respuesta de IgG2b	328
13.5.3.1. Infestaciones	328
13.5.3.2. Inmunizaciones	331
13.5.4. Respuesta de IgG3	337
13.5.4.1. Infestaciones	337
13.5.4.2. Inmunizaciones	340
13.5.5. Respuesta de IgM	349
13.5.5.1. Infestaciones	349
13.5.5.2. inmunizaciones	354
13.5.6. Respuesta de IgA	358
13.5.6.1. Infestaciones	358
13.5.6.2. Inmunizaciones	362
13.6. Estudio de las reacciones cruzadas	367
13.6.1. De los productos de ES	367
13.6.2. De antígeno total	368
13.7. Ensayo de inmunoadsorción	372
13.7.1. ELISA indirecto	372
13.7.2. Western-blot	375

XIV. DETECCIÓN DE EPITOPOS GLUCÍDICOS	378
14.1. Detección de glicoproteínas en el extracto bruto salino	379
14.2. Deglicosilación enzimática	380
14.3. Estudio del efecto de la deglicosilación sobre la respuesta de IgG3	383
14.3.1. ELISA	383
14.3.2. Western-blot	384
XV. ESTUDIO DE LA ESPECIFICIDAD DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES US5 Y US9	391
15.1. Reconocimiento antigénico de los anticuerpos monoclonales sobre las distintas especies de <i>Trichinella</i>	391
15.1.1. Anticuerpos monoclonales	391
15.1.2. Detección de antígenos por western-blot	392
15.1.3. Análisis de la especificidad dentro del género trichinella	392
15.2. Diagnóstico diferencial mediante el empleo de anticuerpos monoclonales en la triquinelosis	395
15.2.1. Diagnóstico por western-blot	396
15.2.2. Diagnóstico en infestaciones mixtas	401
15.2.3. Diagnóstico por ELISA	402
15.2.3.1. Muestras valoradas	402
15.2.3.2. Muestras sin valorar	404
XVI. ESTUDIO DE LA ESPECIFICIDAD DE LA PROTEÍNA PURIFICADA GP53	407
16.1. Obtención de la proteína purificada	407
16.2. Dinámica de la respuesta frente a la gp53	408
16.2.1. Sueros de animales inmunizados con los productos de ES	409
16.2.2. Sueros de animales inmunizados con el extracto bruto salino	412
16.2.3. Sueros de animales infestados	415
16.2.4. Verificación de resultados mediante el empleo de western-blot	416
XVII. DICUSIÓN	419
17.1. Estudios biológicos	419
17.1.1. Nivel de asentamiento intestinal	420
17.1.2. Distribución intestinal	424
17.1.3. Duración de la fase intestinal	428
17.1.4. Ritmo de larviposición	430
17.1.5. Asentamiento muscular e ICR	431
17.2. Estudio del perfil proteico	435
17.3. Estudio de la actividad proteásica	439

17.4. Estudio de la respuesta inmune humoral	444
17.5. Detección de epitopos glucídicos	463
17.6. Utilidad de los anticuerpos monoclonales US5 y US9	466
17.7. Estudio de la proteína purificada gp53	472
XVIII. CONCLUSIONES	480
XIX. BIBLIOGRAFÍA	484

INTRODUCCIÓN

II. INTRODUCCIÓN

La triquinelosis es un proceso posiblemente anterior a la aparición del hombre actual sobre la tierra. Sin embargo, el género *Trichinella* y la enfermedad que produce, se conocen desde hace relativamente poco tiempo. El primer caso conocido de triquinelosis humana se dió en un joven egipcio en el 1.200 a.C. ; diagnosticado 3.200 años después, en sus restos momificados (Millet y col., 1980). Hay indicios suficientes para pensar que varias epidemias a lo largo de la historia de la Humanidad se han debido a una triquinelosis. Es el caso de la ocurrida en el 427 a.C. en los cartagineses que ocupaban Sicilia, o la que en 1827 afectó en Santo Tomás (Antillas) a unas 12.000 personas. Hechos tan graves como estos bien pudieran ser la causa de que fenicios, cretenses, etíopes, egipcios y árabes prohibieran el consumo de carne de cerdo, incluso mediante imperativos religiosos.

Probablemente las primeras observaciones del parásito fueron unas concreciones pétreas blanquecinas en la musculatura de un cadáver, realizadas por Tiedemann en 1821. Aunque es probable que estos diminutos puntitos en la musculatura fueran vistos con cierta frecuencia en las salas de disección, nadie pensó en observarlos al microscopio, entre otras cosas, porque estos escaseaban en los hospitales y se les otorgaba poco valor en la práctica médica. Pero fue Paget en 1835, un joven estudiante de medicina quien intrigado por la observación de estas partículas en un cadáver que estaba diseccionando decidió mirarlas al microscopio, y aunque comunicó su hallazgo en la Albernetian Society, fue Owen, quien lo describió posteriormente como un parásito, en concreto como un nematodo y lo denominó *Trichina spiralis*, ante la Sociedad Zoológica de Londres.

Aunque ya en ese año Wood sospecha que el parásito puede ser el causante de un reumatismo agudo, no se reconoce plenamente su patogenicidad hasta 1860. La enfermedad es detectada en los años siguientes en varios países ; y sus sucesivos brotes, a veces con altos índices de mortalidad, alarman y conciencian rápidamente a la opinión pública. (Campbell, 1983a).

Durante la mitad del siglo pasado, el ciclo biológico y la etiología de la triquinelosis humana y suina fue elucidada por científicos alemanes, así como su epidemiología básica. Durante los 150 años siguientes, el ciclo doméstico entre hombre y cerdo fue detectado en numerosos países. En algunas regiones, especialmente en Europa y la antigua URSS, el problema de la triquinelosis fue tan severo que se instituyó la obligatoriedad de la inspección de toda la carne de cerdo. Hoy día la incidencia de la triquinelosis porcina en estos países es muy baja, generalmente inferior al 0.001%, aunque en USA el porcentaje es considerablemente superior (0.1%), y puede ser aún mayor en países en desarrollo como Egipto, Méjico, la antigua Yugoslavia, China, Nigeria, etc. Además, hay que tener en cuenta el aumento de la incidencia de triquinelosis por consumo de carne de otros animales ; así recientemente en Italia y Francia se han producido varios brotes humanos como resultado del consumo de carne de caballo infestado (Marazza, 1987 ; de Carnieri y col., 1989 ; Pozio y col., 1988, 1998 ; Dupouy-Camet y col., 1988, 1994) . Aunque la incidencia de la triquinelosis en los países desarrollados ha disminuido considerablemente durante este siglo, la triquinelosis supone una significativa carga económica para éstos, ya que es necesario efectuar inspecciones de la carne que resultan costosas para mantener esta baja prevalencia. (K.D. Murrell & F. Bruschi, 1994).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

III. MORFOLOGÍA Y CICLO BIOLÓGICO

La mayoría de los aspectos del ciclo biológico de *Trichinella* fueron descubiertos a lo largo de los 50 años siguientes a su descubrimiento, sin embargo muchos de los detalles de la fase entérica y parenteral no fueron descritos hasta 1960, y aún quedan algunos por resolver. Así, actualmente se sabe que *Trichinella* vive como un parásito intracelular, excepto un breve espacio de tiempo durante la fase migratoria del embrión. Estos hallazgos han influido radicalmente en lo concerniente a las vías específicas que este parásito utiliza para su supervivencia en el hospedador (Despommier, 1983a).

Trichinella es uno de los parásitos con menor especificidad de hospedador que existe en la naturaleza. Se ha observado, tanto de forma experimental como por estudios en poblaciones de animales salvajes, que *Trichinella* puede infestar a casi todas las especies de mamíferos, siendo el hamster chino, la única excepción (Ritterson, 1959).

3.1. FASE INTESTINAL

La infestación se inicia cuando un animal ingiere la forma larvaria infestante L1 (Ali Khan, 1966; Kozek, 1971a) que se localiza en tejido muscular; a continuación el tejido muscular infestado del hospedador, la célula nodriza y la cápsula que se forma alrededor de la larva, deben en primer lugar, ser digeridos en el estómago para liberar al parásito, lo que parece debido a la acción de la pepsina en el medio ácido presente en dicho órgano. Esta fase de la infestación dura solo unos pocos minutos, no sufriendo la larva ninguna otra transformación mientras está en el estómago. A continuación, la larva L1 entra rápidamente en su nicho intracelular en el intestino delgado (Wright, 1979), tan sólo 10 minutos después de que se haya

liberado del tejido muscular (Despommier y col, 1978). Por la forma en que ocupa el parásito este nicho intestinal constituido por una hilera de células epiteliales columnares, se le considera a este estadio como una fase intracelular, y aunque sorprendentemente no se produzca la destrucción de los enterocitos del hospedador como consecuencia de la penetración de la larva, sí tiene lugar un estiramiento de la célula para acomodar al nematodo (Despommier, 1983). El mecanismo bioquímico de la invasión del tejido del hospedador aún no se conoce, y ya que la larva no presenta estilete bucal, se puede asumir que el parásito elabora proteasas, capaces de degradar el tejido del hospedador y facilitar la penetración en los enterocitos (Criado-Fornelio y col., 1992).

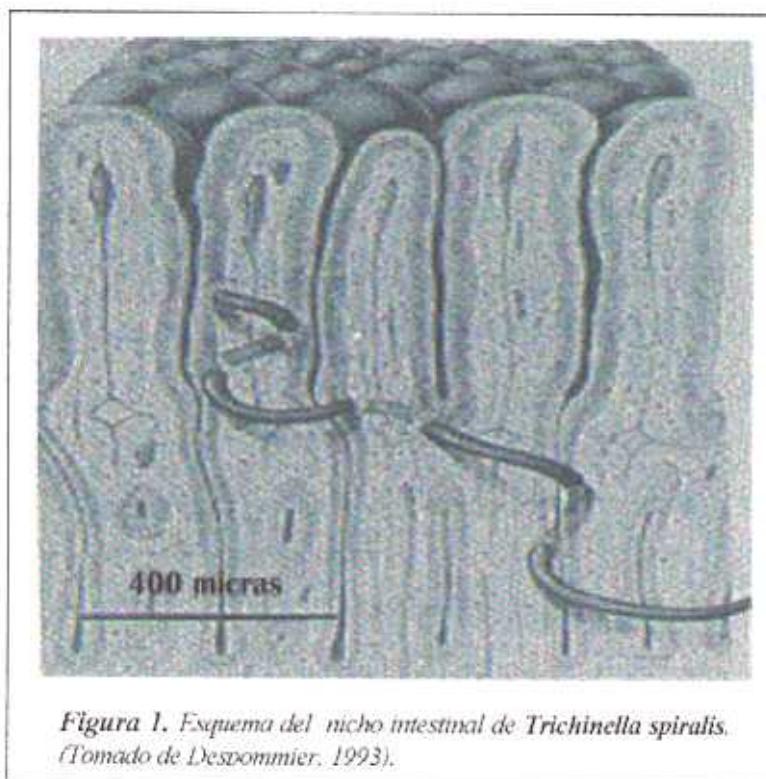
Es en el intestino delgado donde la forma infestante L1 empieza la fase entérica del ciclo biológico, aunque se sabe que puede haber otras localizaciones bajo ciertas condiciones experimentales (por ejemplo útero de rata; McCoy, 1936). La mayoría de los investigadores coinciden en que, dentro del intestino delgado, es el duodeno el lugar de preferencia para el establecimiento de las larvas. Aunque se ha visto en ciertos hospedadores experimentales como cobayas o ratones de la cepa ICI, que las larvas se establecen más frecuentemente en yeyuno o íleon (Roth, 1938; Denham, 1968). Por otro lado, también se ha observado que el establecimiento puede verse afectado por la forma en que se realiza la infestación experimental, por ejemplo si las larvas administradas se inoculan en volúmenes elevados (0.5-1 ml por ratón), aproximadamente el 50% de las mismas puede situarse en porciones más alejadas del intestino delgado, incluso yeyuno e íleon (Sukhdeo & Croll, 1981). También parece ser importante la motilidad intestinal en la localización del parásito, así, si al animal de experimentación se le administran relajantes musculares, la mayoría de los gusanos se disponen en la porción más anterior del duodeno (Sukhdeo & Croll, 1981). Otro factor que afecta a la localización intestinal es la edad del hospedador (Larsh &

Hendricks, 1949; Campell, 1967; Dick & Silver, 1980), de forma que los gusanos parecen disponerse en posiciones más distantes en el intestino en ratones jóvenes (24–48 días), en comparación con ratones de más edad (130–140 días). También, y aunque la mayor parte de los mamíferos son susceptibles de ser hospedadores para *Trichinella*, distintos estados fisiológicos pueden, dentro de un mismo hospedador, influir en el número de gusanos que se establezcan en su intestino. El sexo del hospedador puede influir en el número de larvas infestantes recuperadas de músculo, aunque no siempre de la misma manera, así por ejemplo para la cepa de ratón ICI, en el caso de las hembras se recupera un número tres veces superior de larvas que en el caso de los machos (Denham & Martínez, 1970); y por el contrario para las ratas, en las hembras hay prácticamente el mismo número que en los machos (Manku & Hamilton, 1972). En cualquier caso, en ninguno de estos estudios se determinó que estadio del ciclo se veía afectado por esta característica. Más recientemente Sukhdeo (1991) ha afirmado que existe relación entre la localización intestinal y la fecundidad de los adultos, de forma que éstos tienden a establecerse en mayor número, en aquellos lugares del intestino cuyas condiciones físico-químicas favorecen su reproducción.

La dieta (Saowakontha, 1975 ; Castro y col, 1974), la presencia y tipo de flora intestinal (Stefanski & Przyjalkowski, 1964 ; Przyjalkowski & Golinska, 1978 ; Przyjalkowski, 1968; Przyjalkowski & Wescott, 1969) o la temperatura corporal (Lightner & Ulmer, 1974 ; Chute, 1961) también juegan un papel importante en el establecimiento del parásito.

Una vez en el nicho intestinal se producen cuatro mudas en una rápida sucesión, durante un período de unas 30 horas. Las mudas probablemente ocurren en el nicho intracelular (Wright, 1979). En numerosos estudios se ha tratado de indagar sobre los factores que podían influir en las mudas (Weller, 1943 ; Kim, 1961, 1962 ; Meerovitch, 1962, 1965 a y b ; Tarakanov, 1963,

1964, 1970; Tarakanov & Krasnova, 1971 ; Thomas, 1965 ; Berntzen, 1965; Hicho & Thorson, 1971; Sakamoto, 1979).



En dos de estos estudios (Berntzen, 1965; Sakamoto, 1979) se pudo observar la formación de la cutícula y completar las cuatro fases de muda, desde larva L1 hasta adulto, cuando la primera era expuesta a pancreatina y a tripsina, después de ser aisladas del tejido del hospedador por medio de digestión péptica, siendo al parecer necesario dejar que los embriones se arrastraran a través de una fina malla como prerequisite para que se produjera la primera muda. Esta primera muda parece suceder de forma análoga a como sucede en otros animales, de forma que *Trichinella* también necesita una barrera física contra la que frotarse para eliminar una parte o todas las capas cuticulares externas, y la superficie de los enterocitos podrían servir para este propósito. *In vitro*, el paso de L2 a adulto aparentemente se produciría sin ninguna ayuda física externa.

La cutícula de primer estadio se ha podido detectar en los enterocitos circundantes empleando métodos de inmunocitocalización, utilizando un anticuerpo dirigido contra un epítipo presente en la epicutícula (Capo y col., 1984). En este estudio, los enterocitos eran normales en apariencia, pero no se hizo una investigación detallada de su funcionalidad o de su morfología ultraestructural, desconociéndose igualmente el destino de las cutículas eliminadas de la segunda a la última muda (Despommier, 1993).

Trichinella no incrementa significativamente su tamaño en anchura durante estas primeras 30 horas, lo cual posiblemente refleja el alto grado de selección impuesto por este entorno intramulticelular, de forma que los gusanos de mayor anchura no podrían acomodarse dentro del citoplasma de las células epiteliales columnares, y sería por tanto una forma de selección, mientras que el incremento del gusano en longitud puede ser fácilmente tolerado. Así, la hembra adulta crece un vez y media en longitud desde la última muda hasta el día cinco, mientras que el crecimiento de los machos es menor, tan solo un 20-30% durante este mismo tiempo (Wright, 1979).

Además de este crecimiento durante la muda, se producen una serie de cambios morfológicos, cambios que van a afectar a la cutícula, célula glandular hipodermal, músculos, nervios, primordio genital, tracto intestinal y esticosoma; la mayor parte de este desarrollo se va a llevar a cabo utilizando casi completamente las reservas de glucógeno (Ferguson & Castro, 1973).

La cutícula de la larva L1 está formada por dos regiones mayores separadas por una zona electrodensa (Beckett & Boothroyd, 1961; Despommier y col., 1967; Ribas-Mujal & Rivera-Pomar, 1968; Bruce, 1970a; Kozek, 1971b; Purkerson & Despommier, 1974) ; mostrando, según diversos autores, diferencias antigénicas (McLaren y col., 1987 ; Takahashi y col., 1990a ; Choy y col., 1991), afirmando además que deberían ser tratadas

como estructuras distintas (Takahashi y col., 1990a). Existen dos finas capas a modo de membranas en la parte más externa de la cutícula, y otras dos capas más por debajo de estas. Estas cuatro estructuras fueron originalmente descritas como tres capas (Beckett & Boothroyd, 1961), pero el empleo de micrografías ha permitido diferenciar entre la tercera y la cuarta capa. Estas últimas capas sólo se han podido encontrar en la superficie de la cutícula de la larva L1. Ribas-Mujal & Rivera-Pomar (1968) primero las describieron en la fase parenteral, y propusieron que ambas eran estructuras derivadas del hospedador, sugiriendo más tarde que la verdadera superficie externa de la cutícula era la denominada capa 2. Sin embargo, otros investigadores fueron capaces de demostrar con una fijación apropiada y una lenta deshidratación a través de series de etanol de distinta graduación, que las capas 3 y 4 no se podían separar anatómicamente de la superficie del gusano (Purkerson & Despommier, 1974).

Durante el proceso de muda, la cutícula cambia en cuanto a su estructura (Kozek, 1971b), dando lugar a la cutícula del adulto, ya durante la segunda muda.

La célula glandular hipodermal es una estructura inusual de función desconocida, encontrada en la familia *Trichuridae*, al igual que en otras familias de nematodos de vida libre (Wright & Hope, 1968). Esta célula periódicamente interrumpe la superficie de la cutícula y su ultraestructura en el adulto ha sido descrita por Bruce (1970a). En el adulto, esta célula subcuticular forma cuatro hileras, dos dorsales y dos ventrales, que discurren a lo largo de la mayor parte del cuerpo del animal. La larva L1 no posee esta célula, al contrario que el resto de los estadios (de L2 a adulto) durante la fase entérica (Bruce, 1970a).

El contenido extracelular de la célula en el gusano adulto forma un tapón de material fibroso y es muy probablemente secretado en su interior, ya que este material estaba presente en las nuevas células glandulares situadas por debajo de la superficie de la vieja cutícula durante el tiempo de la muda. En la larva L2, el material fibroso parece mostrar cierta susceptibilidad a la digestión péptica (Bruce, 1974). Es por tanto razonable que este tipo de célula no esté presente en la larva L1, ya que ésta debe atravesar el estómago antes de alcanzar el epitelio columnar del intestino delgado, lo cual se apoya en el hecho de que las larvas de 24–28 horas (por ejemplo L4) no son capaces de establecerse cuando se inoculan por vía oral (Katz, 1960). Por el contrario se sabe que los gusanos adultos pueden sobrevivir y reproducirse después de pasar por el estómago (Katz, 1960 ; Matoff, 1961, 1963).

La musculatura de la larva y del adulto de *Trichinella* está formada de músculos somáticos y esofágicos, y músculos asociados al aparato reproductivo. La musculatura somática va a cambiar durante la muda, aunque la única diferencia entre las células de las larvas y de los adultos es que la de estos últimos son más alargadas y más numerosas (Richels, 1955) y contienen menos glucógeno (Bruce, 1970a ; Ferguson & Castro, 1973). La deplección de las reservas de glucógeno en la larva se produce rápidamente durante su transformación en adulto, disminuyendo de un 15% a un 1% (Ferguson & Castro, 1973). En todas las fases, el gusano presenta un movimiento similar al de una serpiente excepto en el caso de la forma infestante L1, en el que son de enrollamiento y desenrollamiento. (Despommier, 1983)

Respecto del sistema nervioso de la larva L1, este es básicamente igual al del adulto y está constituido por un anillo nervioso cefálico del que parten cuatro cordones nerviosos principales: dos laterales, uno dorsal y otro ventral. El neurotransmisor que parece estar implicados es la acetilcolina, ya que se ha demostrado la presencia de acetilcolinesterasa en el tejido nerviosos del

adulto (Ramisz, 1965).

Mediante estudios de comportamiento, se ha puesto de manifiesto que todas las fases entéricas parecen responder a gradientes de temperatura emigrando hacia las zonas más calientes (Despommier, 1973). Estos datos pueden sugerir que *Trichinella* posee termorreceptores integrados en su musculatura, probablemente en el anillo nervioso cefálico.

Sin embargo, aunque no se conocen los mecanismos por los cuales hembras y machos se comunican su posición en el intestino (Despommier, 1993), la capacidad para encontrarse podría explicarse por la existencia de quimiorreceptores sensibles a las feromonas (Bonner & Egtes, 1967).

Los órganos de reproducción están parcialmente indiferenciados en la larva L1, pero maduran rápidamente durante el proceso de morfogénesis que acontece durante las 30 horas siguientes a su establecimiento en el intestino (Wu & Kingscote, 1957; Villela, 1958; Berntzen, 1965; Ali Khan, 1966; Shanta & Meerovitch, 1967; Kozek, 1971a, 1975). Este fenómeno de desarrollo sexual que muestran las larvas L1 es único entre los nematodos, quizá las presiones selectivas que han dado como resultado este alto grado de maduración están inexorablemente unidas a su necesidad de desarrollarse rápidamente en el intestino tras la infestación por vía oral. (Despommier, 1983). Los cambios externos más marcados en la morfología se producen durante el desarrollo del macho. Los apéndices copuladores y sus estructuras asociadas están presentes ya en la larva L2. Las estructuras asociadas con dichos apéndices (dos juegos de pequeñas papilas accesorias), se ven ya perfiladas por debajo de la cutícula de la larva L3, pero sólo aparecerán totalmente desarrolladas en el adulto. La producción de esperma ocurre justo antes o inmediatamente después de la última muda (Wu, 1955a; Ali Khan, 1966; Kozek, 1971a). En la hembra el único ovario y el oviducto se

desarrollan progresivamente durante los procesos de muda.

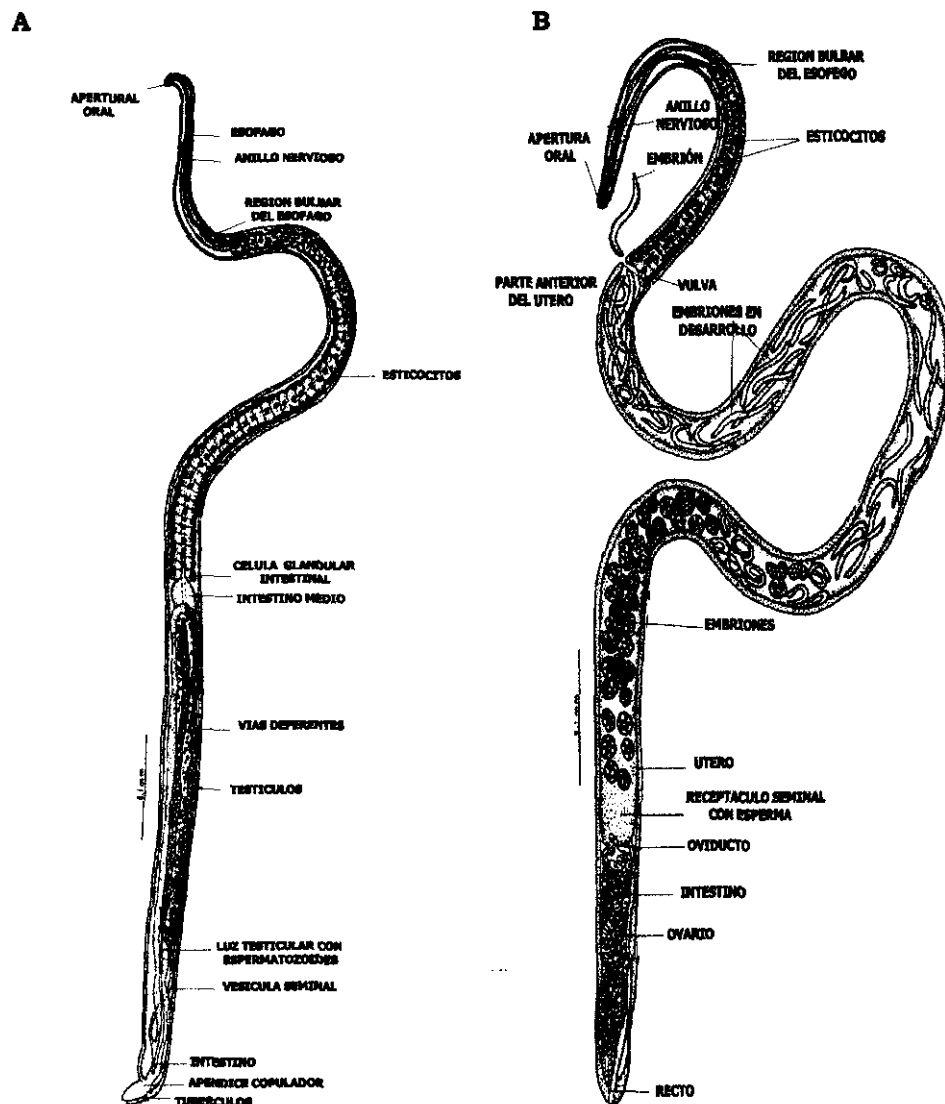


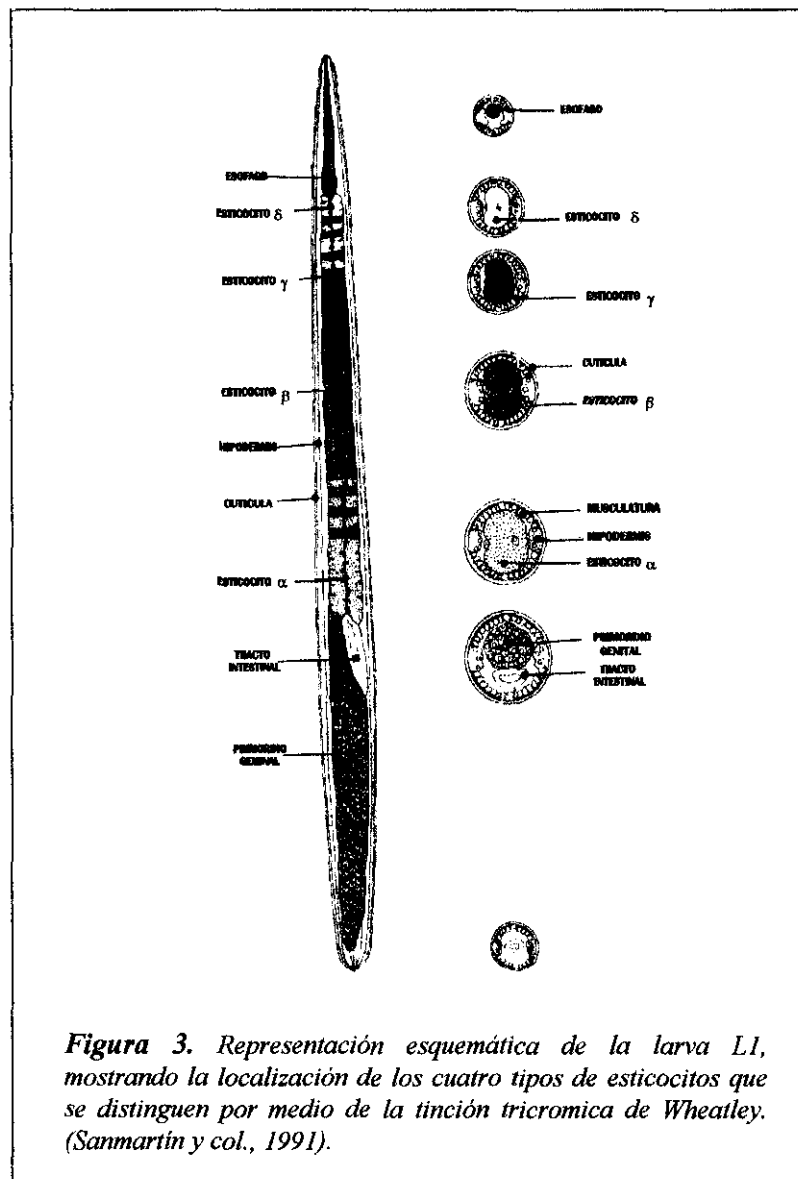
Figura 2. (A) Representación del macho adulto de *T.spiralis*. (B) Representación de la hembra adulta de *T.spiralis*. Tomado de Villela (1970).

Trichinella posee un tracto intestinal completo tanto en las formas de la fase intestinal como parenteral. Distinguiéndose tres regiones denominadas esófago, intestino y recto. Tanto esófago como recto están revestidos de una porción de cutícula (Beckett & Boothroyd, 1961; Bruce, 1966, 1970b; Despomer y col., 1967; Backwinkel & Themann, 1972). El

intestino está revestido de epitelio columnar, presentando cada célula microvellosidades, sugiriendo que podrían tener como misión la absorción de nutrientes (Beckett & Boothroyd, 1960 ; Bruce, 1966; Despommier y col., 1967). Sin embargo, en numerosos estudios *in vitro* sobre la larva L1 y el adulto, se ha observado lo contrario, es decir, que el tracto intestinal tiene capacidad secretora (Campbell, 1955; Chipman, 1957; Jackson, 1959; Mills & Kent, 1965; Despommier & Müller, 1970, 1976), observándose la aparición de inmunoprecipitados alrededor de los orificios anal y oral de las L1, cuando eran incubadas con anticuerpos formados durante la infestación.

El esticosoma está constituido por una hilera de 50-55 células discoidales (Chitwood, 1930; Chitwood & Chitwood, 1950; Richels, 1955; Wu, 1955b; Villela, 1970) denominados esticocitos y que ocupa la mitad anterior de la L1. La estructura y la función de este órgano han sido ampliamente estudiadas, observándose que los esticocitos poseen gránulos secretores, cuyo contenido es antigénico (Campbell, 1955; Jackson, 1959; Mills & Kent, 1965; Despommier & Müller, 1970, 1976; Brzosko y col., 1965; Kozek & Crandall, 1974). Inicialmente se describieron dos clases de esticocitos en la larva L1, unos que contenían gránulos β localizados en la región anterior y otros que poseían gránulos α , situados en la porción posterior del esticosoma. (Despommier & Müller, 1976). Posteriormente se han descrito cinco subtipos de gránulos, denominados α_0 , α_1 , α_2 , β y γ , que difieren en forma, tamaño, tipo de inclusiones, antigenicidad y localización en el esticosoma (Takahashi y col., 1989, 1990b). En función del tipo de gránulos que contienen, se han descrito tres clases de esticocitos, α , β y γ . Estas células secretan el contenido de dichos gránulos durante el proceso de muda hacia el citoplasma de su nicho intramulticelular, actuando estas sustancias como posibles agentes modificadores de dicho nicho necesario para el parásito, puesto que el gusano gasta una considerable cantidad de energía en

su síntesis, almacenaje y secreción (Despommier, 1993). Sin embargo, aún no se conoce la función bioquímica de dichas secreciones, aunque haya sido posible obtener un ADNc que codifica una proteína específica secretada por la L1 (Vassilatis y col., 1992). Sanmartín y col. (1991), empleando una tinción diferencial han descrito un cuarto tipo de esticocitos, denominados δ , aunque no pudieron establecer si contenían o no gránulos secretores.



La función precisa de estas secreciones en el hospedador aún es desconocida, pero existen especulaciones (Despommier, 1974; Despommier & Müller, 1976), sobre si, la respuesta inmune dirigida contra estas sustancias tiene una profunda influencia en el resultado de la infestación (Despommier, 1977).

El esticosoma del adulto difiere significativamente del de la larva L1, aunque su número se mantiene a lo largo del proceso de muda, justo después de la cuarta muda, los esticocitos del adulto se reorganizan, de forma que van a estar desprovistos de los gránulos secretores y de glucógeno (Despommier, 1974); a las 48 horas después de la infestación se pueden volver a observar los gránulos secretores dentro del citoplasma, siendo estos gránulos más irregulares y más alargados que los que presentaba la larva. Estos esticocitos han sido denominados tipo I y tipo II para diferenciarlos de los de la larva (Takahashi y col., 1993).

Inmediatamente después de la madurez sexual se produce el apareamiento (Hemmert-Halswick & Bugge, 1934; Wu & Kingscote, 1957; Ali Khan, 1966; Kozek, 1971a; Gardiner, 1976).

Diversos experimentos han establecido que, justo antes de la inseminación, la relación en el intestino entre machos y hembras oscila entre 1,5-2:1 (Boyd & Huston, 1954; Podhajecky, 1963; Denham, 1968) y va aumentando a lo largo de la infestación cuando empieza la expulsión de los adultos como consecuencia de la respuesta inmune (Rappaport, 1943; Gursch, 1949; Campbell & Cuckler, 1966). Parece existir un sistema de feromonas que actuaría como medio de atracción-repulsión, de forma que los machos repelerían a otros machos (Bonner & Etges, 1967; Belosevic & Dick, 1980), mientras que las hembras atraerían a los machos pero no viceversa (Belosevic & Dick, 1980a).

Una vez fecundadas las hembras comienza la embriogénesis que tiene lugar en el útero. Este proceso dura aproximadamente 90 horas y los embriones nacen vivos, saliendo a través de la vulva. Existen numerosos estudios acerca de la fecundidad de las hembras aisladas, observándose amplias diferencias en función del hospedador y de la especie del parásito. Para determinar el intervalo de producción de embriones por hembra se han empleado sistemas *in vitro* en los que se procedía al recuento de los embriones puestos por cada hembra de forma individual (Despommier y col., 1977) durante 24 horas, determinando a la vez el número de hembras que permanecen aún en el intestino a distintos días y, multiplicando el número de embriones producidos por día *in vitro* por el número de hembras presentes cada día, se obtenía un número muy próximo al de las larvas recuperadas de músculo.

Stewart y col. en 1980 desarrollaron una serie de experimentos empleando varios hospedadores y condiciones, con el fin de definir un ensayo *in vitro* de puesta de embriones para determinar la fecundidad de los adultos. No observaron diferencias en cuanto a la fecundidad en función de si las hembras se incubaban solas o en grupo, o si además estaban presentes los machos. Sin embargo, las hembras que se aislaban de yeyuno o íleon ponían menos embriones que aquellas que se recogían de duodeno. La temperatura también era un factor que afectaba a la puesta, disminuyendo el número de embriones tanto por encima como por debajo de los 37°C. Por otro lado, también parecía afectar el número de larvas administradas al hospedador, de forma que, en infestaciones altas (más de 500 larvas por ratón) las hembras ponían menos embriones que aquellas que procedían de ratones infestados con dosis más pequeñas (125 ó 250). Estos estudios estaban en concordancia con otros previos sobre superinfestaciones y fecundidad (Tanner, 1968; Chirasak, 1971), en los cuales se observaba que las hembras procedentes de infestaciones altas ponían menor número de embriones.

3.2. MIGRACIÓN DEL EMBRIÓN A SU NICHOS.

La ruta en el hospedador que sigue *Trichinella* hasta alcanzar su nuevo nicho intracelular ha sido estudiada por numerosos investigadores (Cerfontaine, 1895; Askanazy, 1895; Graham, 1897; Staubli, 1905; Mauss & Otto, 1942; Berntzen, 1965; Nelson y col., 1966; Basten & Beeson, 1970; Harley & Gallicchio, 1971). Las evidencias más importantes se apoyan en dos estudios sobre ratas en los que el conducto torácico fue canulado durante la infestación. En el primer estudio, los embriones fueron recogidos en grandes cantidades entre día 6 y 7 p.i. (Basten & Beeson, 1970). Sin embargo, éste fue un hallazgo accidental, ya que el objetivo era recoger linfocitos y no gusanos. En el segundo, realizado por Harley & Gallicchio en 1971, se canuló a los animales infestados con 3000 larvas *per os*, desde día 4 a 15 p.i., recogiendo además las larvas durante su emigración en sangre, fluido abdominal y en varios órganos incluyendo pulmones, hígado y riñones. Se observó que el 60% de las larvas migratorias se recogían en linfa, y el resto en los diferentes órganos, especialmente en el hígado y los pulmones. A pesar de que en este estudio se llegaba a la conclusión de que la vía predominante de migración era la vía linfática, posteriormente Wang & Bell en 1986, demostraron que las larvas pasaban a través de la mucosa intestinal hacia el torrente sanguíneo y no a los vasos linfáticos como hasta entonces se había creído (Despommier, 1976), y luego por vía porta entraban en el hígado y sólo una pequeña proporción pasaba a los vasos linfáticos y migraba a través del conducto torácico y a la circulación venosa central.

La localización definitiva de las larvas va a ser el músculo estriado esquelético. Se han realizado diversos estudios para determinar qué músculos esqueléticos son los infestados con preferencia, tanto en infestaciones naturales como experimentales, en una amplia variedad de hospedadores, incluyendo cerdos (Thornbury, 1897; Olsen y col., 1964), ratones (Barriga,

1978 ; Stewart & Charniga, 1980), rata (Leonard & Beahm, 1941; Oliver, 1961) y hombre (Forrester y col., 1961). De ellos se desprende que el asentamiento muscular estaría influenciado bien por los estímulos eléctricos de las células hospedadoras (Hughes & Harley., 1977) y las reacciones del sistema nervioso de las triquinas, o bien por tratarse de los músculos más activos, como diafragma y masétero (Despommier, 1982). Sin embargo, en otros trabajos se detecta una mayor correlación entre la localización física del músculo y el porcentaje de recuperación de larvas (Stewart & Charniga, 1980), con cierta tendencia a situarse en la parte anterior del cuerpo.

El número de larvas infestantes recuperadas a día 30 post-infección ha sido usado por numerosos investigadores como índice de éxito de la infestación para un hospedador dado, observándose grandes variaciones entre unos a otros, lo cual se puede explicar por:

- El número de gusanos adultos que se llegan a establecer en el intestino del hospedador.
- El número de embriones puesto por hembra.
- La longevidad de los adultos en el nicho intracelular intestinal.
- La supervivencia de los embriones durante la migración.
- El establecimiento con éxito y desarrollo de la larva infestante L1 en su nicho muscular

3.3. FASE MUSCULAR

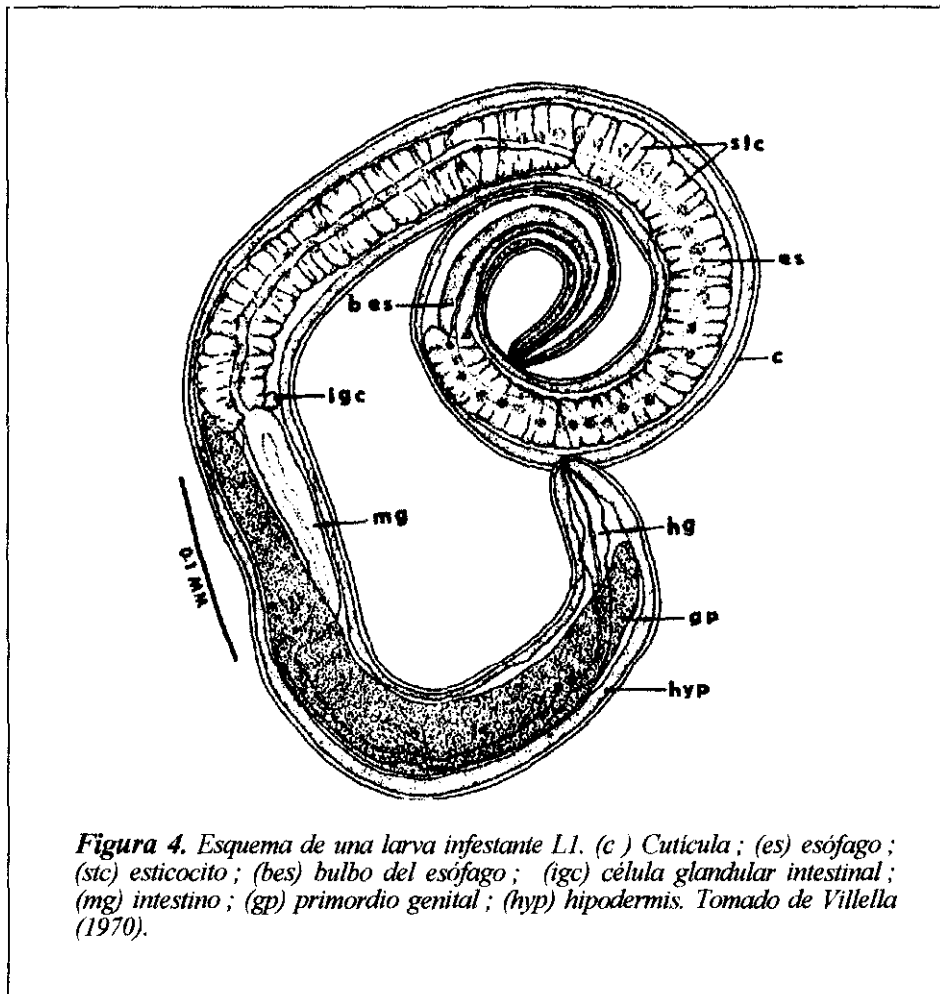
La penetración de la larva en la fibra muscular parece ser un proceso mecánico, que se lleva a cabo con la ayuda de un estilete bucal en tan sólo 10 minutos (Despommier, 1975), aunque hay que tener en cuenta la posibilidad de que intervengan también enzimas hidrolíticas, ya que se han encontrado signos de fractura en la zona donde se produce la penetración (Despommier,

1975; Hughes & Harley, 1977 ; Robertson y col., 1989).

Ya una vez dentro de la célula hospedadora, tanto ésta como el parásito van a sufrir una serie de modificaciones. *Trichinella*, que hasta este momento se la ha denominado como larva preinfestante L1 o embrión, crece y se diferencia entre los días 4 y 20 después de que haya penetrado en la célula muscular (Despommier y col., 1975; Richels, 1955; Wu, 1955b; Villella, 1970). Sin embargo, el único órgano que se desarrolla plenamente durante esta fase es el esticosoma (Richels, 1955; Wu, 1955; Ali Khan, 1966; Bruce, 1974; Despommier, 1975; Despommier & Müller, 1976), ya que el primordio genital no evoluciona, aunque ya existía cierta diferenciación sexual previa y la cutícula se engrosa progresivamente, pero sin llegar a la diferenciación. El número de esticocitos se incrementa desde 19 ó 20 en el día 1 de esta fase (Richels, 1955), hasta 50-55 a día 20 (Richels, 1955; Wu, 1955b; Villella, 1970; Despommier & Müller, 1976). Como ya se mencionó previamente, los gránulos presentes en los esticocitos contienen antígenos y la antigenicidad de las células se puede demostrar por técnicas inmunohistoquímicas, (Jackson, 1959; Brzosko & Gancarz, 1969; Zimmerman y col., 1973 ; Despommier & Müller, 1976 ; Crandall & Kozek, 1974 ; Takahashi y col., 1990 ; Lee y col., 1991 ; Mizuno y col., 1991 ; Niimura y col., 1992 ; Takahashi y col., 1992 ; Niimura & Tatsuoka, 1996) desprendiéndose de estos estudios que la síntesis de antígeno empieza sobre día 9-10 después de la penetración, mientras que la granulocitosis ocurriría más tarde, alrededor del día 14.

El momento en que *Trichinella* nuevamente es infestante para otro hospedador durante esta fase, ha sido objeto también de numerosos estudios. Villella en 1970 hizo una revisión al respecto concluyendo que el carácter infestante se alcanza entre los días 17 y 21. Podría parecer entonces que la infestabilidad es dependiente de la presencia de gránulos secretores

en los esticocitos, ya que el contenido de los gránulos parece ser necesario para las funciones vitales del gusano. (Despommier, 1983).



Durante el periodo inicial de su estancia intracelular, la larva aparece asociada con el citoplasma de la célula hospedadora sin que se encuentre limitada por una membrana (Despommier, 1975; Lee & Shivers, 1987) y posteriormente esta célula sufre una serie de modificaciones como la desaparición de las estrías (Drachaman & Tunchay, 1965; Gabryel & Gustowska, 1967), desorganización de los filamentos contráctiles, hipertrofia y desplazamiento del núcleo e incremento del volumen de la porción ocupada de la miofibrilla (Faske & Themann., 1961; Ribas-Mujal & Rivera-Pomar,

1968; Backwinkle & Themann, 1972; Despommier, 1974; Purkenson & Despommier, 1974). El citoplasma se llena de vesículas secretoras del retículo endoplásmico rugosos, mitocondrias y complejos de Golgi (Despommier, 1975; Hulinska y col., 1985; Gabryel y col., 1987; Lee & Shivers, 1987; Chang, 1989; Ko y col., 1994), se incrementa la cantidad de colágeno (Ritterson, 1966; Bruce, 1970; Stewart & Read, 1972; Teppema y col., 1973, Despommier, 1975), perdiendo las características de célula muscular y adquiriendo la condición de célula nodriza (Faske & Themann., 1961; Ribas-Mujal & Rivera-Pomar., 1968; Backwinkle & Themann., 1972; Despommier, 1975). Esta estructura es independiente del resto del tejido muscular y funciona almacenando nutrientes para la propia célula y para la larva, a la vez que elimina desechos metabólicos y productos derivados de ésta al espacio extracelular (Despommier y col, 1990). Otro cambio significativo inducido por el parásito en la célula afectada es el reposicionamiento de la misma en el ciclo celular. Mientras que las células musculares diferenciadas finalizan el ciclo celular y permanecen en la fase G₀, las células infestadas por *T. spiralis* son inducidas a entrar nuevamente en el mismo y a replicar su ADN, permaneciendo aparentemente suspendidas en la fase G₂/M. La replicación del ADN de la célula hospedadora parece completarse cinco días después del establecimiento de la larva y la suspensión del ciclo celular en G₂/M parece ser una característica persistente de la infestación, pudiendo durar desde varios meses hasta incluso años (Jasmer, 1993). Se ha sugerido así, que en la regulación de estas características fenotípicas estarían involucrados una serie de derivados del parásito siendo probablemente expresados por los estadios más tempranos de la larva (Jasmer & Neary, 1994).

La larva a partir de este momento permanecerá en este estado en espera de un nuevo hospedador, sin que por ello permanezca inactiva, ya que además de captar nutrientes, va a ser capaz de moverse en el interior de la célula nodriza.

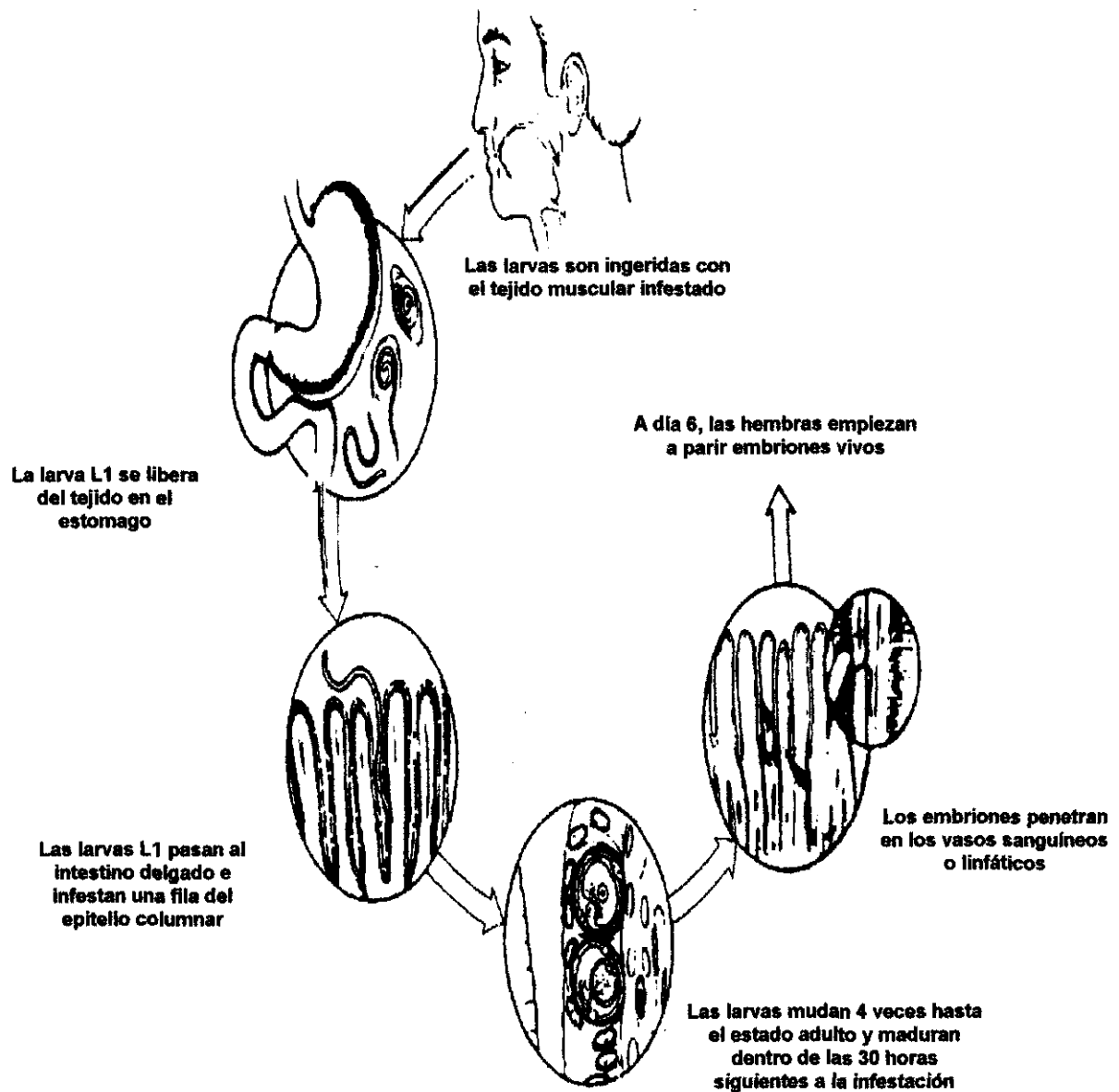


Figura 5. Fase entérica de *T. spiralis*. Tomado de Capó y Despommier, 1996.

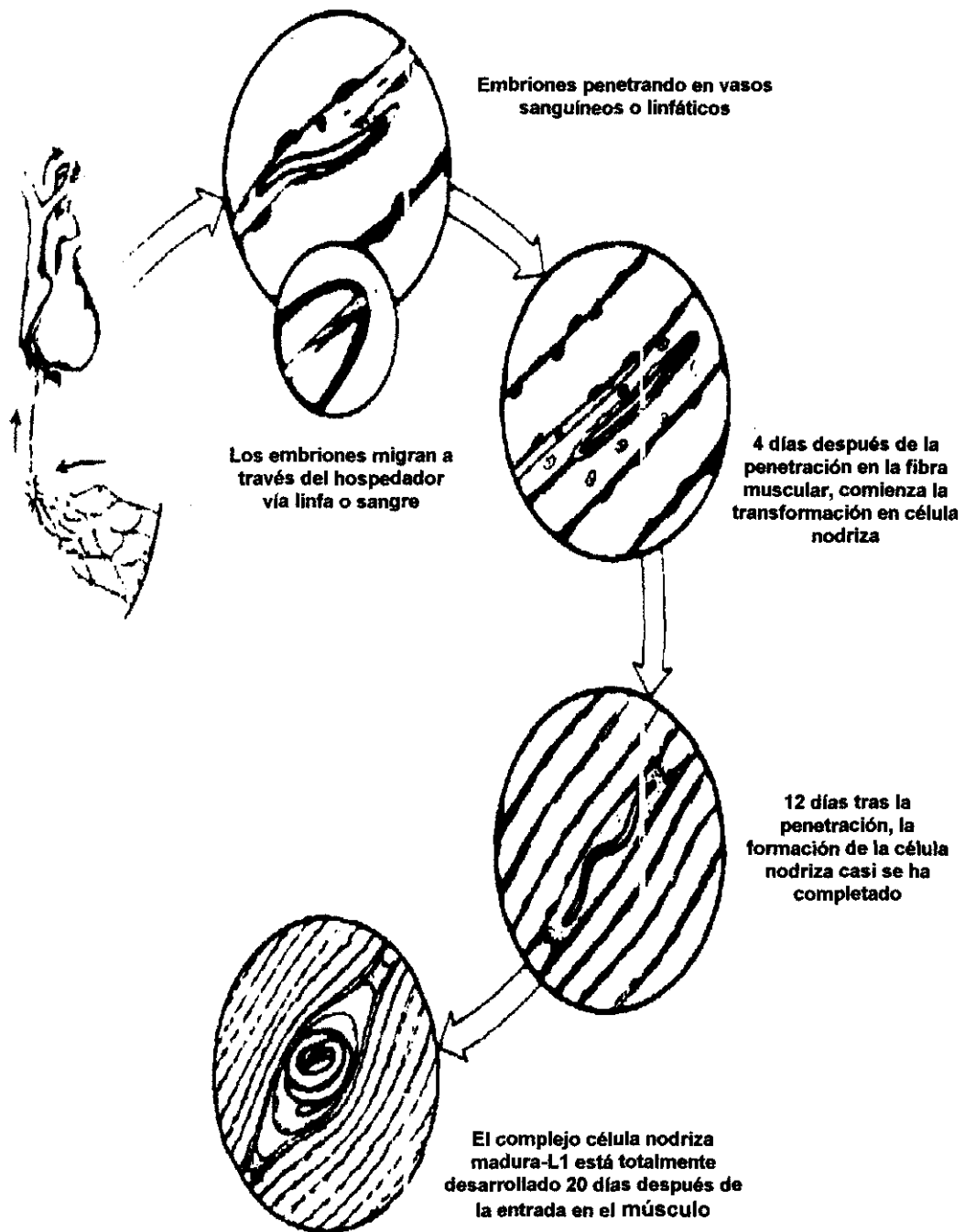


Figura 6. Fase parenteral de *T. spiralis*. Tomado de Capó y Despommier, 1996

IV. CICLOS EPIDEMIOLÓGICOS

La epidemiología de *Trichinella* se consideró en sus inicios, que estaba ajustada a un modelo muy simple, en el que el cerdo era el principal responsable de la triquinelosis humana (Campbell, 1983b). Este concepto ha variado hacia una situación más compleja, en la que hay que considerar la participación de diversos animales salvajes en el mantenimiento del ciclo en la naturaleza y la existencia de variantes regionales del parásito, hoy ya consideradas como especies, que presentan una mayor o menor infestabilidad para los animales sinantrópicos (como ratones, ratas, cerdos).

Siguiendo a Martínez Fernández (1997) se pueden distinguir cuatro tipos de ciclos que describiremos a continuación :

- Ciclo urbano o sinantrópico.
- Ciclo rural europeo.
- Ciclo silvestre africano.
- Ciclo silvestre nórdico.

4.1. CICLO URBANO O SINANTRÓPICO

La especie tradicionalmente relacionada con este ciclo es *T.spiralis*. Este ciclo se origina por la actividad humana. El hombre se llega a infestar por el consumo de carne de cerdos domésticos infestados, sin embargo la fuente de infestación para los cerdos, ha sido más difícil de identificar.

Una forma de infestación del cerdo con la que siempre se ha estado de acuerdo ha sido por el consumo de carne de otros cerdo (normalmente en forma de basura no cocida). Entre 1874 y 1890, varios investigadores

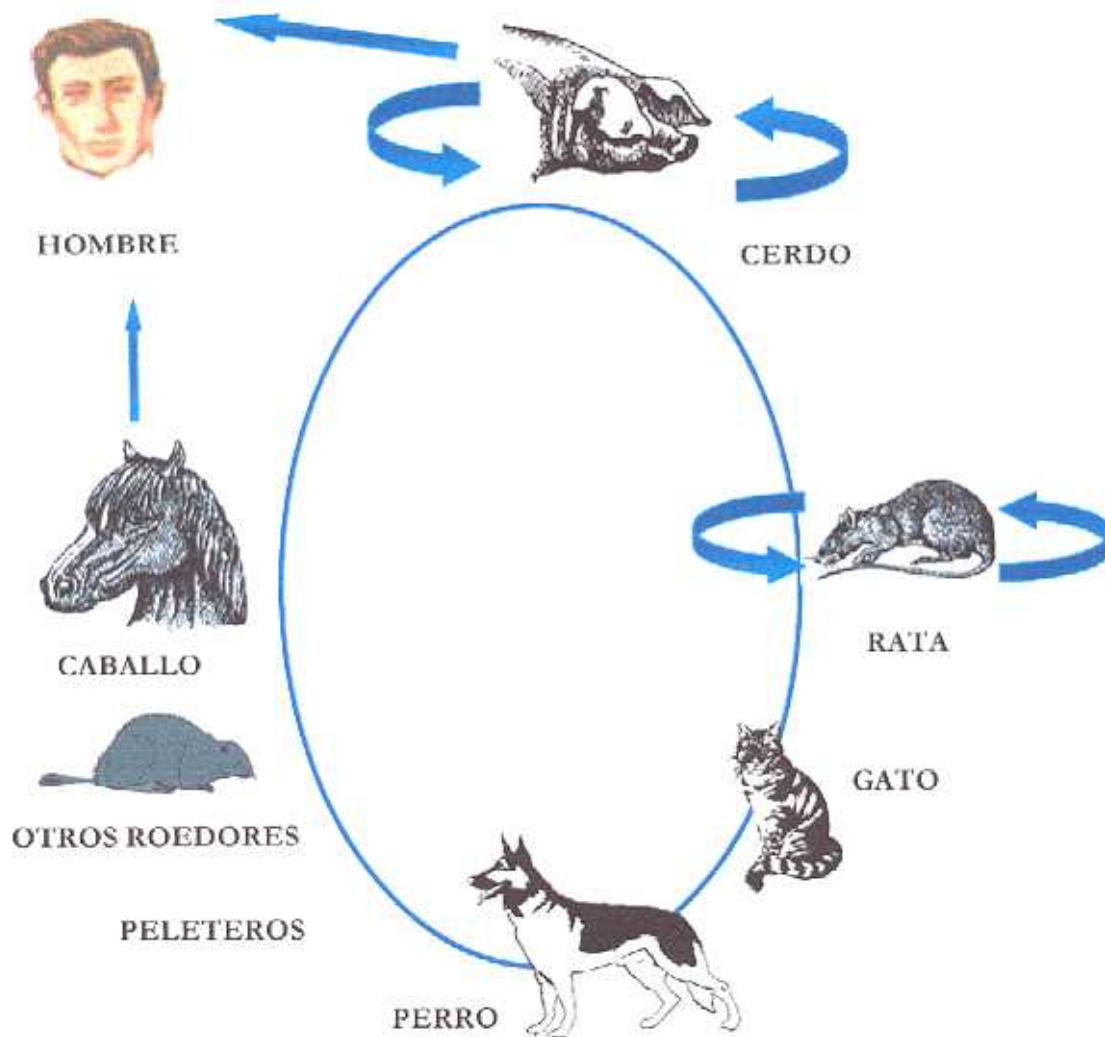
en los EE.UU. vieron que la incidencia de *Trichinella* en los cerdos alimentados de basura era mucho más alta que en los cerdos alimentados de pienso o criados en dehesas. La reducción de la alimentación de estos animales con basuras no cocinadas y de despojos, impuesta para el control de las infecciones bacterianas y víricas, se vió seguido también de una marcada reducción en la incidencia de la triquinelosis en cerdos, consiguiéndose a la vez una fuerte evidencia circunstancial del papel de las basuras en la transmisión del parásito (Hall, 1937).

Otras formas en las que *Trichinella* es transmitido de cerdo a cerdo, de particular interés con respecto a los cerdos alimentados con pienso, es mediante procesos de canibalismo (por ejemplo las mordeduras de la cola) (Zimmermann y col., 1962) o por la ingestión de heces de otros cerdos que hayan sido recientemente infestado (Schnurrenberger y col., 1964).

Sin embargo, tradicionalmente, la principal controversia ha sido la importancia del papel que juegan las ratas en la infestación de los cerdos. *Trichinella* es relativamente común en las ratas, especialmente en aquellas que viven cerca de los vertederos de las ciudades, y no hay duda de que las ratas, al menos en teoría, transmiten el parásito a otras ratas, a carnívoros salvajes y a cerdos domésticos. Mientras unos investigadores creían que la ingestión de ratas representaban una fuente significativa de infestación para los cerdos, otros consideran a las ratas infestadas meros indicadores de la existencia de infestación en los cerdos locales.

Cameron (1970) dudaba de si estos animales eran realmente importantes en la infestación de los cerdos, señalando la dificultad para los cerdos de cazar ratas y la repugnancia que estos mostraban a comerse una muerta. Sin embargo, en otros experimentos (Murrell y col., 1984), en los que se dejó a los cerdos tener acceso a ratas infestadas y muertas (no evisceradas ni despellejadas), éstos comieron lo suficiente como para

llegar a infestarse. Además Schad y col. (1987) demostraron que las ratas podían transmitir la infestación bajo ciertas condiciones, y mantener la triquinosis en una granja en ausencia de la transmisión cerdo-cerdo.



Ciclo epidemiológico urbano típico de *Trichinella spiralis*
(Adaptado de Martínez Fernández, 1997)

Por otro lado, existen animales en el entorno urbano, carnívoros u omnívoros, como perros, gatos, hurones o animales peleteros que también pueden intervenir en el mantenimiento de este ciclo.

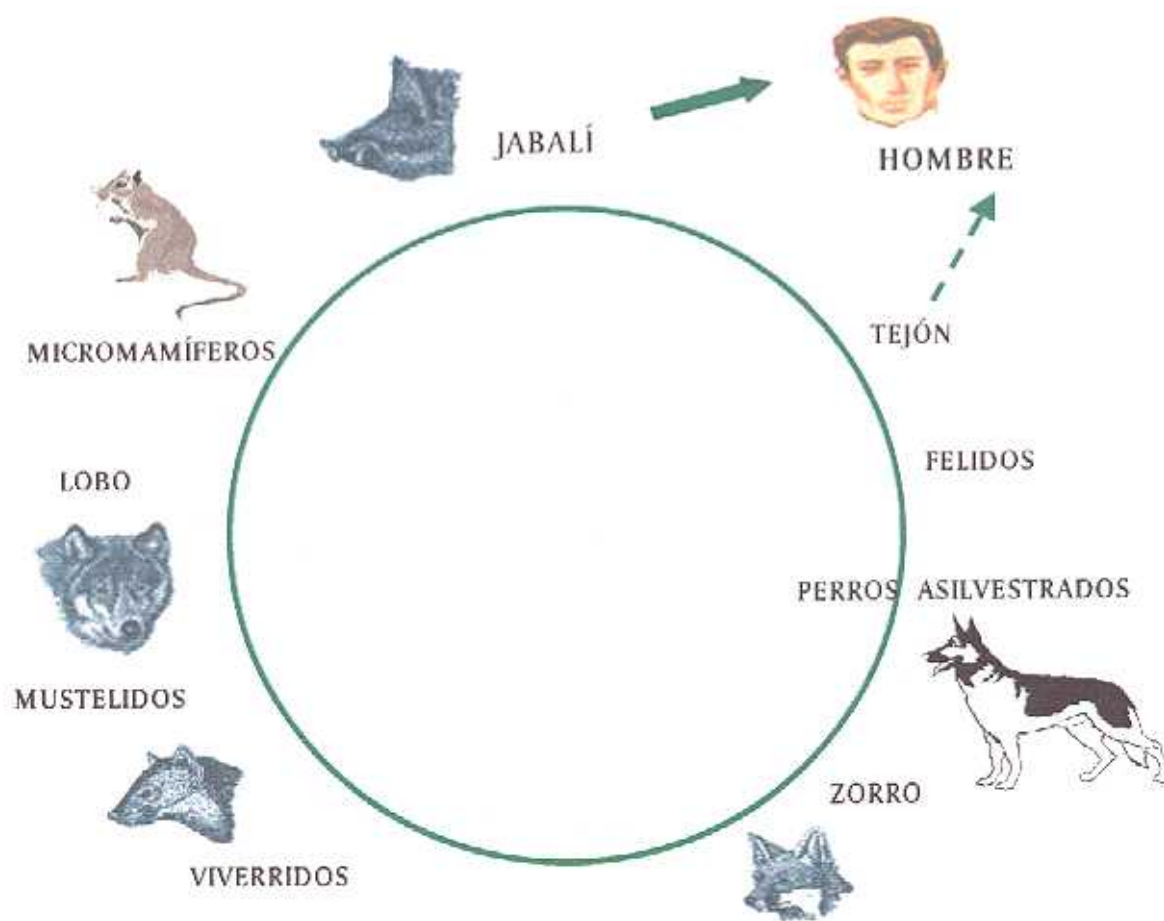
4.2. CICLO SILVESTRE

Aunque se sabía que la triquinelosis es una zoonosis que se transmitía del cerdo al hombre, durante muchos años no se tuvo un conocimiento real de su existencia en la naturaleza. Durante el siglo pasado se recogieron informes que señalaban la presencia de larvas de *Trichinella* en varios animales salvajes, pero no fue hasta hace unos 50 años cuando se llegó a tener clara la amplia distribución de este parásito en la naturaleza y su transmisión en un ciclo silvestre, de forma independiente al del hombre y los animales domésticos. Dentro de este ciclo silvestre podemos considerar dos aspectos:

- Transmisión entre depredador y presa como resultado del carnivorismo. Ya que los pequeños roedores constituyen una presa fácil para los carnívoros y a través de la cadena alimentaria, este parásito puede mantenerse y transmitirse a los carnívoros silvestres, a pesar de los bajos niveles de infestación detectados en dichos roedores. (Schad & Chowdhury, 1967).
- Transmisión por consumo de carroña. Vía que parece tener gran importancia a nivel epidemiológico (Madsen, 1976; Cameron, 1970; Raush, 1970; Zimmermann, 1971). Los animales salvajes que se infestan con *Trichinella* son carnívoros u omnívoros, y parece razonable aceptar la propuesta de que pueden llegar a infestarse por el consumo de carroña de carnívoros muertos. Los grandes carnívoros de vida larga probablemente juegan un papel particularmente importante, porque pueden acumular durante bastantes años un número significativo de larvas del parásito en su musculatura y porque sus canales suponen un copioso material infestante.

Aunque la transmisión de *Trichinella* por medio de la carroña no debería ser efectiva si la muerte del hospedador conllevara la destrucción de la célula nodriza o de la cápsula y la consiguiente muerte de la larva, el actual concepto de la cápsula como una célula muscular viva y en transformación, induce un aspecto nuevo y confuso dentro del contexto de la carne muerta. Presumiblemente la célula ya no actuaría como nodriza cuando el hospedador ya no está vivo, y quizá la larva, entonces use reservas alimenticias endógenas, mientras aún esté protegida, más o menos mecánicamente, dentro de la cápsula.

4.2.1. CICLO RURAL EUROPEO



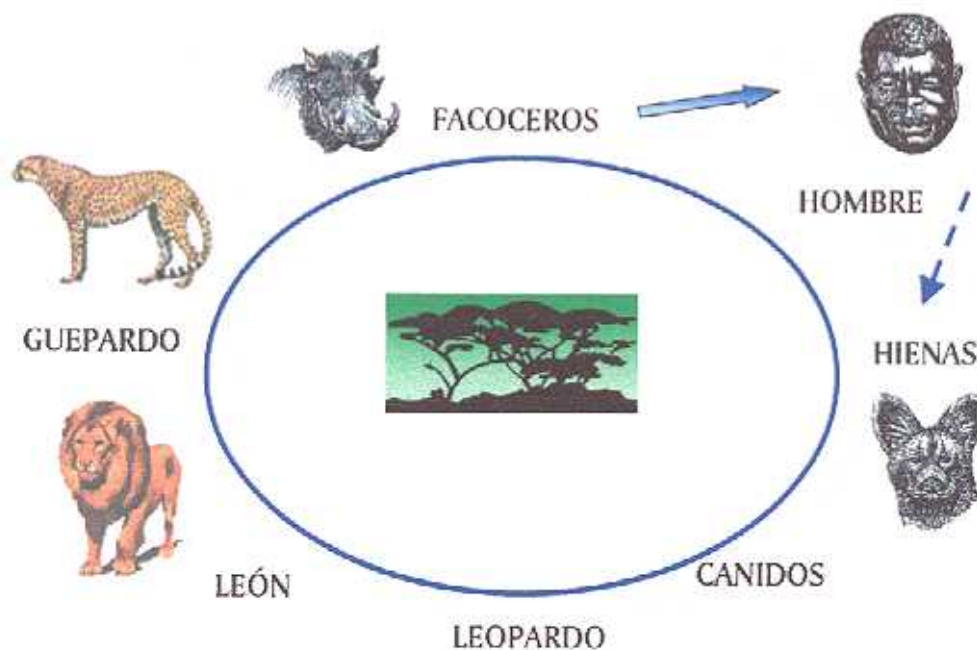
Ciclo silvestre rural europeo

(Adaptado de Martínez Fernández, 1997)

En este ciclo se encuadra a la especie *T.britovi* y en algunos casos a *T.spiralis*. Circula entre los animales silvestres omnívoros y carnívoros. La conexión directa con el hombre se produce por la ingestión de alguna especie comestible, principalmente el jabalí. Cada una de las especies que intervienen, salvo los micromamíferos, son suficientes para mantener el ciclo, debido a los ya mencionados fenómenos de canibalismo, carroñerismo y depredación.

4.2.2. CICLO SILVESTRE AFRICANO

Si bien la triquinelosis se ha considerado durante largo tiempo como una enfermedad de regiones templadas y árticas, se ha podido comprobar sin embargo, que era también endémica en las regiones tropicales. La especie responsable de este ciclo es *T.nelsoni*.



Ciclo silvestre africano típico de *T. nelsoni*

(Adaptado de Martínez Fernández, 1997)

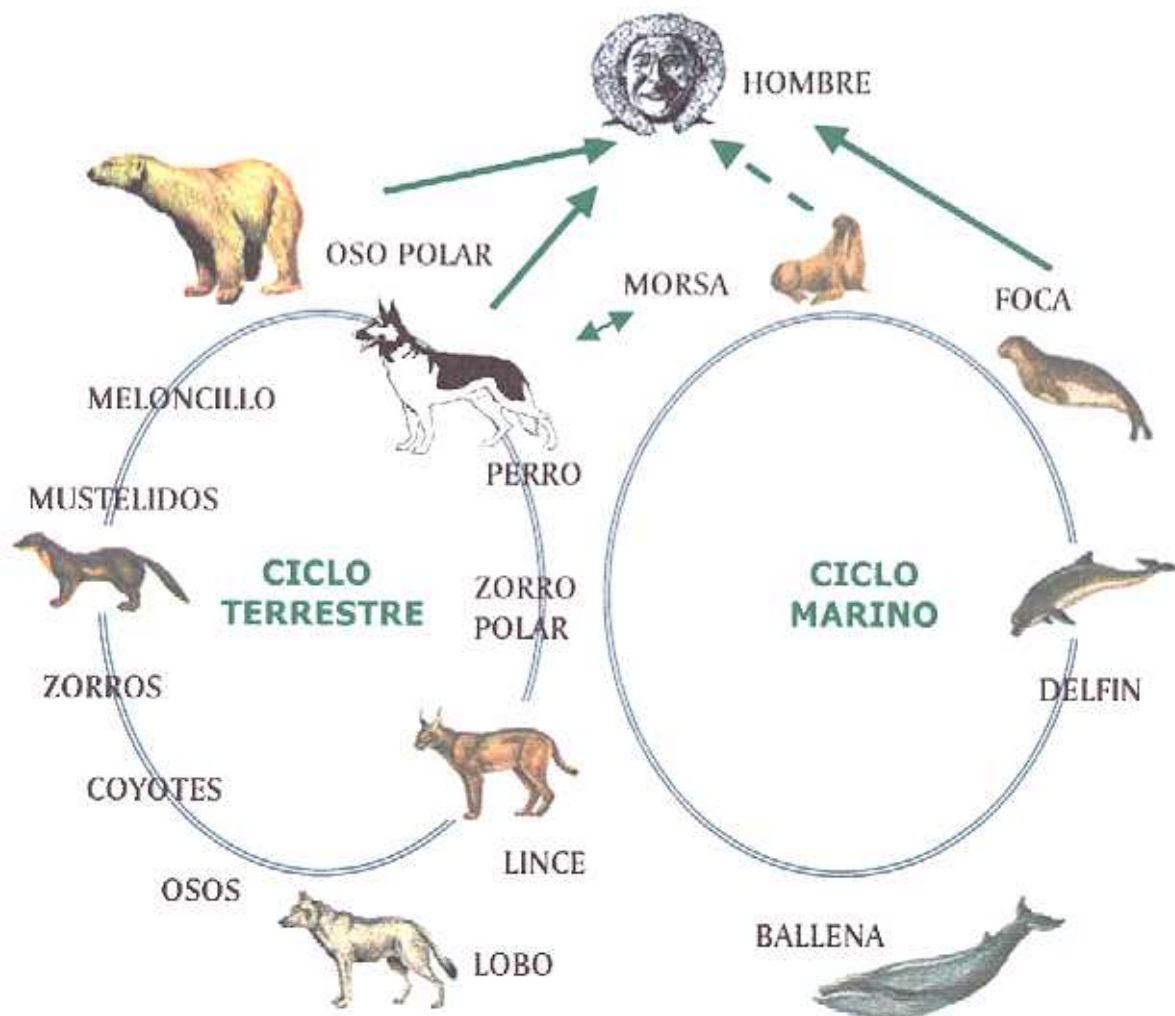
Los hospedadores salvajes que pueden actuar perpetuando el ciclo selvático en las regiones tropicales y subtropicales, incluyen a varios hiénidos, cánidos y félidos en Africa Oriental (Nelson, 1970), el civeto en India (Schad & Chowdhury, 1967) y el chacal en Irán (Massoud, 1978). En estas regiones, y en Tailandia (Khamboonrungy col., 1978), los suínos silvestres son fuente importante de infestación para el hombre, pero los roedores salvajes, están en la mayoría de las regiones notablemente libres de *Trichinella*, excepto en los alrededores de las ciudades (Campbell, 1983b).

4.2.3. CICLO SILVESTRE NÓRDICO

Este ciclo que se da fundamentalmente en el Ártico y Subártico, y ocurre tanto en mamíferos terrestres (oso polar, oso pardo, zorro ártico, lobo, lince) como en mamíferos marinos (morsa, foca). La resistencia a las bajas temperaturas mostrada por los aislamientos implicados en este ciclo (*T.nativa*), permite que las larvas enquistadas conserven su capacidad infestante tras largos periodos de tiempo, en los que la carne puede permanecer congelada.

Los osos polares pueden infestarse por el consumo de carne de focas y por el consumo de carne de animales terrestres, incluyendo los de su propia especie (Fay, 1960; Manning, 1961). Otros mamíferos del Ártico terrestre probablemente pueden infestarse de una forma similar; sin embargo la infestación de los mamíferos marinos es aún un enigma. Las morsas normalmente se alimentan de moluscos y otros invertebrados, pero algunos individuos pueden adoptar una dieta a base de carne de mamíferos, especialmente cuando la comida escasea. Es poco probable que dichas "morsas carnívoras" depreden a focas vivas, pero hay evidencias de que comen carne de focas muertas, es decir, es probable que coman

cualquier tipo de carne. Dada la infestación en focas y mamíferos terrestres, no es difícil que la infestación en morsas sea consecuencia del carroñerismo y de la depredación (Fay, 1960 ; Manning, 1961). Por otro lado, la infestación en focas es más difícil de explicar. La prevalencia de la infestación es baja, y esencialmente confinada a la foca barbada, (*Erignathus barbatus*), y a la foca anillada (*Pusa hispida*), y no se les considera el componente principal de este ciclo (Rausch, 1970).



Ciclo silvestre nórdico típico de *T. nativa*
(Adaptado de Martínez Fernández, 1997)

Se ha especulado sobre si las focas que se alimentan fundamentalmente de peces e invertebrados, pueden infestarse por la ingestión de pequeños crustáceos que se alimenten de carroña en el mar. Britov demostró que ciertos crustáceos anfípodos podían ingerir el parásito enquistado en porciones de carne y eran capaces de transmitir la infestación mecánicamente a un hospedador mamífero experimental, de forma que estos crustáceos no llegan a infestarse, sino que simplemente transportan la larva hasta un hospedador susceptible. La larva se puede mantener en el intestino del crustáceo incluso más de 28 horas (Hulebak, 1980). Más recientemente Moretti y col. (1996) han comprobado un fenómeno similar de forma experimental empleando para ello diversas especies de peces.

4.3. CIRCUNSTANCIAS EPIDEMIOLÓGICAS ESPECIALES

En ciertas circunstancias los ciclos domésticos y silvestres pueden estar conectados entre sí. Por ejemplo, la carne de oso puede, a través del hombre, ser ingerida por el cerdo doméstico; en ciertas culturas los cadáveres humanos quedan expuestos a animales de vida libre, si éstos están infestados por *Trichinella*, la parasitación puede pasar a cerdos u otros animales silvestres. Las ratas de basureros o domésticas, además de mantener el ciclo por canibalismo, puede, al menos en teoría, unir ambos. Los osos pueden acudir a vertederos e infestarse con los restos de productos porcinos. El hombre puede favorecer determinados ciclos al permitir a los animales el acceso a los cadáveres de animales peleteros (de los que solo se aprovecha la piel) o perros de trineo, que pueden solaparse con el ciclo doméstico o silvestre. (Campbell, 1983b).

Entre los herbívoros, muchos de ellos han sido experimentalmente infestados, habiéndose citado infestaciones naturales en el caballo, que incluso han dado origen a brotes epidémicos humanos, como en Italia o Francia (Marazza, 1987 ; de Carnieri y col., 1989 ; Dupouy-Camet y col., 1988, 1994 ; Pozio y col., 1988, 1998). Se ha sugerido que estos animales se infestan a partir de carne de rata o ratón presente en el forraje.

4.4. SITUACIÓN EPIDEMIOLÓGICA EN LA UNIÓN EUROPEA

La triquinelosis sigue siendo endémica en la mayoría de los países de la Unión Europea (UE), a pesar de que ciertas regiones se las considera libres de esta parasitosis. Por otro lado, la situación en alguno de los países miembros no esta totalmente descrita y caracterizada, y es necesario por tanto en estos casos el aislamiento y la identificación de las especies presentes, tanto en animales domésticos como silvestres. Hasta el momento han sido tres las especies encontradas en la UE, *T.spiralis*, *T.britovi* y *T.nativa* (Pozio, 1998).

➤ Triquinelosis en el ámbito salvaje.

Generalmente, la triquinelosis silvestre afecta a carnívoros con comportamiento carroñero o canibalista. En la mayoría de las regiones de la UE, el reservorio específico es el zorro rojo (*Vulpes vulpes*), aunque en Finlandia, parece serlo también el mapache (*Nyctereutes procyonoides*). En el caso de los mustélidos (marta, tejón, etc), aunque pueden llegar a infestarse, por su reducida población, parecen tener un papel secundario en la ecología de la triquinelosis silvestre.

Investigaciones recientes sugieren que *T.britovi* y *T.nativa* sobreviven solo entre las poblaciones de carnívoros salvajes que viven en ecosistemas naturales. Esta situación epidemiológica se apoya en la presencia de estas dos especies de *Trichinella* en carnívoros salvajes procedentes de ecosistemas naturales que no han sido alterados por el hombre (como parques nacionales, zonas salvajes remotas o áreas de montaña). El factor clave responsable de la distribución limitada de estas especies es el hábito alimentario de los hospedadores principales, ya que parece que el canibalismo y carroñerismo ocurre más frecuentemente en las áreas salvajes que en las áreas menos remotas, porque los cadáveres de los animales no resultan atractivos como alimento para aquellos carnívoros que viven cerca de habitats humanos, donde pueden alimentarse fácilmente de basuras y animales domésticos. Se ha observado que en las regiones central y sur de la UE, la prevalencia es mayor entre los zorros que viven en zonas por encima de los 400–500 m. sobre el nivel del mar y en las áreas protegidas. Además, el clima de montaña caracterizado por la mezcla de altas y bajas temperaturas parece favorecer la supervivencia de las larvas en la carroña del hospedador, durante largos períodos de tiempo.

- En los países del norte (Suecia y Finlandia) la triquinosis silvestre está más ampliamente difundida que en las regiones del sur y centro, ya que el impacto humano sobre el ecosistema de los primeros ha sido menor.
- En Austria, Bélgica, sudeste de Francia, Alemania, y sur de Suecia, donde también está presente el ciclo doméstico, los carnívoros silvestres pueden actuar tanto como hospedadores de *T.spiralis* como de *T.britovi*. En Francia, los zorros presentan una prevalencia de *T.spiralis* del 26,3% en las áreas endémicas, encontrándose además estos hospedadores a altitudes

comúnmente inferiores a aquellos infestados por *T.britovi*, sugiriendo por tanto, que dichas infestaciones tendrían un origen doméstico.

- En Italia, parece existir solo el ciclo salvaje, posiblemente el tipo de comportamiento humano y la barrera geográfica que suponen los Alpes han impedido el asentamiento de *T.spiralis* en el ciclo doméstico y la transmisión de esta a los animales salvajes.

➤ **Triquinosis en el ámbito doméstico.**

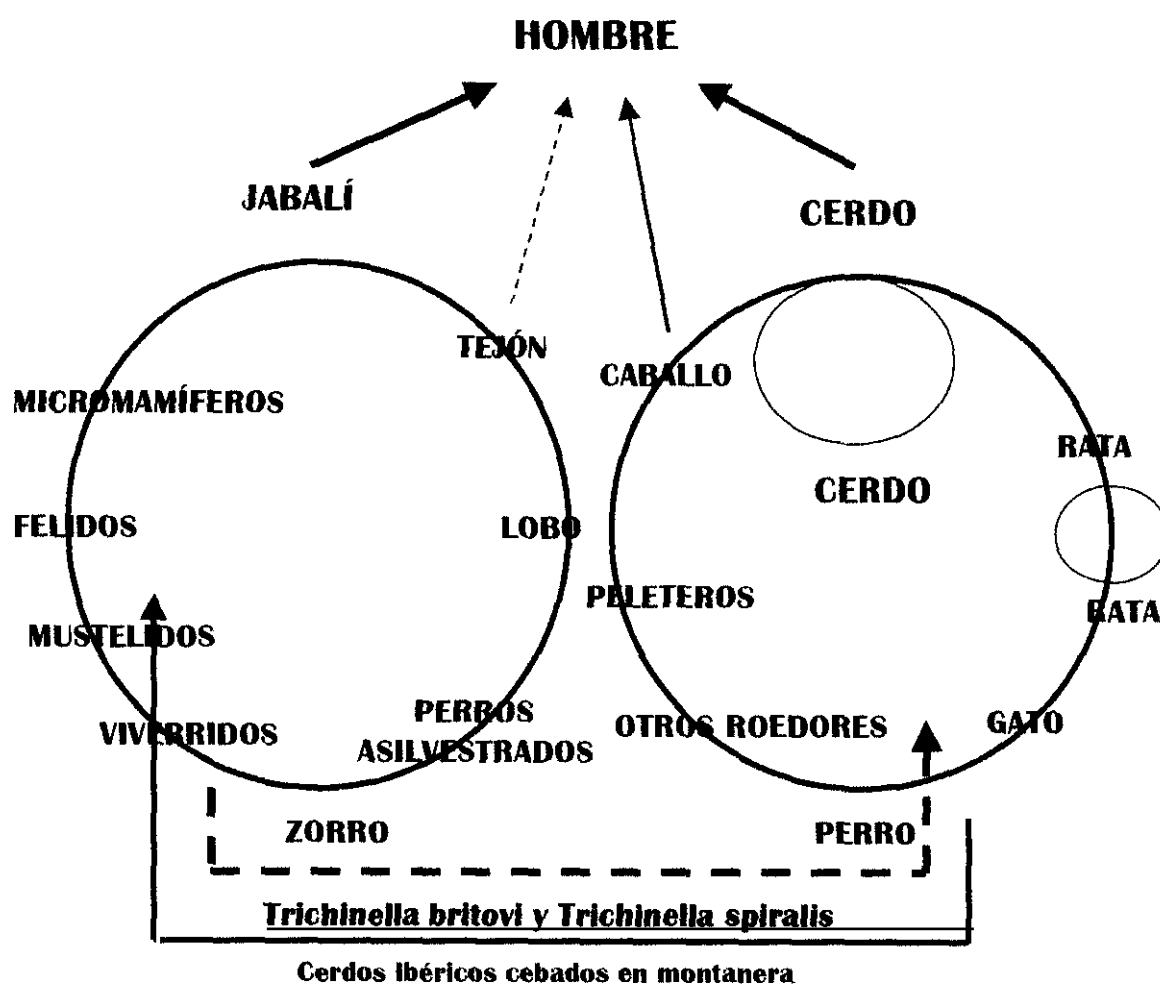
El ámbito doméstico, por el contrario, no resulta ser el medio adecuado para *T.britovi* y *T.nativa*, ya que el índice de capacidad reproductiva en cerdos y roedores sinantrópicos es muy baja. Estos hechos biológicos determinan una severa restricción para la transmisión desde los animales salvajes a los hospedadores asociados con el hombre. Hay pocos datos sobre la presencia de *T.britovi* y *T.nativa* en animales domésticos, aunque son capaces de infestarlos y por otro lado, *T.spiralis* puede volver al ciclo doméstico desde el silvestre, cuando no existe un control eficaz de los animales salvajes y domésticos por:

- Pastoreo de animales domésticos (cerdos y caballos) en áreas silvestres remotas.
- Alimentación de los animales domésticos con restos de animales silvestres.
- Consumo de ganado porcino sin que previamente se haya sometido a un análisis de detección de triquinosis.

Afortunadamente los animales domésticos infestados con las especies silvestres de *Trichinella* suponen un “callejon sin salida” para el propio ciclo silvestre.

El ciclo doméstico (en el que estaría implicado *T.spiralis*) parece ocurrir exclusivamente en áreas rurales de España y en el sur de Finlandia, donde aún prevalece la crianza tradicional del cerdo (por ejemplo pequeñas granjas, con menos de 400 cabezas, donde pueden entrar en contacto con otros animales domésticos y sinantrópicos y se alimentan con productos de origen animal).

Ciclo epidemiológico silvestre (rural europeo) y urbano.
Interconexión en la Península Ibérica.
(Martínez Fernández, 1997)



Sin embargo, es importante conocer la prevalencia y el modo de transmisión en cada zona geográfica ; así en nuestro país, según Martínez Fernández (1990), los ciclos epidemiológicos silvestres pasan al ciclo epidemiológico rural y doméstico o directamente al hombre, en todo el área de explotación de las razas porcinas ibéricas, a través del contacto del cerdo de montanera con la fauna silvestre que actúa de reservorio. En el norte (Asturias, Zamora, etc) el paso de triquinela al cerdo y al hombre puede ser inverso, es decir, desde los carnívoros de la fauna silvestre que acuden a los corrales de los caseríos durante el invierno (Cordero del Campillo, 1969).

➤ **Áreas libres de *Trichinella*.**

Los análisis rutinarios han confirmado la ausencia de triquinosis en Dinamarca y en los Países Bajos ; y en las Islas Británicas no se recogen casos desde 1969. Sin embargo, hay regiones de las que no se dispone de datos suficientes como para concluir que están libres del parásito como el noroeste de Francia, el valle del Po y otras mesetas de Italia y de las islas del Mediterráneo (Córcega, Cerdeña, Sicilia).

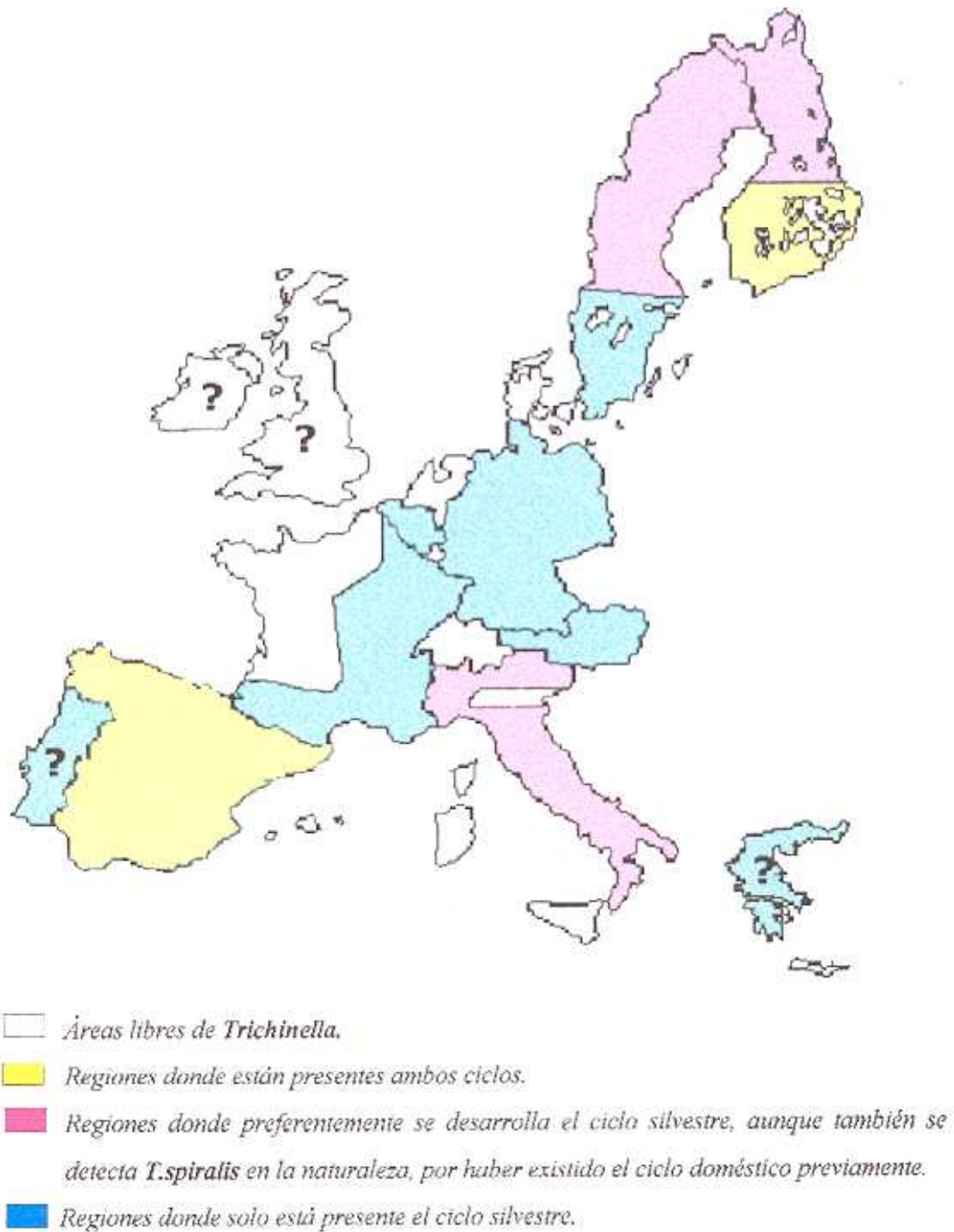


Figura 7. Distribución de la triquinelosis doméstica y silvestre en los países de la UE.
 (Tomado de Pozio, 1998)

V. ENCUADRE TAXONÓMICO

En 1896, Railliet siguiendo las normas de prioridad taxonómica propuso cambiar el nombre de *Trichina spiralis* por el de *Trichinella spiralis*, ya que en 1830 el vocablo *Trichina* había sido empleado para denominar un género del orden *Díptera*.

La clasificación taxonómica propuesta por Dick (1983a) es la siguiente :

REINO : *ANIMAL*

SUBREINO : *METAZOA*

PHYLUM : *NEMATHELMINTES*

CLASE : *APHASMIDIA* von Linstow , 1905

ORDEN : *ENOPLIDA* Chitwood , 1933

SUPERFAMILIA : *TRICHUROIDEA* Railliet, 1895

FAMILIA : *TRICHINELLIDAE* Ward, 1907

SUBFAMILIA : *TRICHINELLINAE* Ramson, 1911

GENERO : *TRICHINELLA* Railliet, 1895

La enorme inespecificidad de *Trichinella* y la amplia gama de hospedadores susceptibles, han conducido, posiblemente, a unos mecanismos de especiación poco ostensibles. Por ello, desde su descubrimiento, se pensó que solo existía la especie *T. spiralis* (Owen, 1835), Railliet 1895. Esta visión quedó relegada a un segundo plano cuando Forrester, Nelson y Sander en 1961 describieron unos parásitos con

características biológicas distintas. Este aislamiento, procedente de un brote ocurrido en Kenia en 1959, presentaba una baja infestabilidad en ratas de laboratorio, ratas silvestres y cerdos domésticos, en comparación con un aislado de referencia originario de Inglaterra (Nelson & Mukundi, 1963).

En el año 1966 Nelson, Blackie y Mukundi en su artículo "Comparative studies on geographical strains of *Trichinella spiralis*", concluían en la necesidad de realizar más estudios sobre *Trichinella* ya que parecían existir numerosas "razas geograficas", cada cual adaptada para la transmisión entre un particular y complejo sistema de depredador-presa, y que por tanto sería fundamental su estudio para conocer la epidemiología de la enfermedad.

Por otro lado, Kozar & Kozar (1965) llevaron a cabo experimentos en cepas de ratas y ratones de laboratorio observando que, aunque el aislado Kenia presentaba relativamente una baja infestabilidad en éstos, la refractariedad no era tan marcada como la indicada por Nelson para este mismo aislado. Por otro lado, también observaron que la supervivencia en ratones, tras la exposición a grandes cantidades de larvas de este aislado, se incrementaba después del primer pase. En estos mismos experimentos observaron que un aislado procedente de Polonia tenía unas características intermedias entre el aislado Kenia y el aislado de referencia que tenían en el laboratorio. Por ello, estos autores indicaron que en las áreas donde "el círculo de hospedadores esta cerrado durante un período de tiempo prolongado, su capacidad para adaptarse a nuevos hospedadores puede llevar al desarrollo de una variante regional del parásito".

Sin embargo la primera evidencia experimental que apoyaba la existencia de diferencias genéticas y morfológicas entre una *Trichinella* silvestre (procedente de animales salvajes) y otra sinantrópica (de cerdos domésticos) fue publicada por Britov en 1969, utilizando para ello pruebas de entrecruzamiento de triquinelas recogidas de varios animales. De acuerdo a los resultados de estas pruebas de entrecruzamiento se describieron en primer lugar dos variantes (Britov, 1971) a las que posteriormente se les dió la categoría de especies, *T.nativa*, para las regiones árticas y *T.nelsoni*, para las regiones tropicales (Britov y Boev, 1972), que eran morfológicamente indistinguibles de *T.spiralis* (de las regiones templadas del hemisferio norte). Además en ese mismo año, Garkavi propuso otra especie más, *T.pseudospiralis*, que se caracterizaba por un menor tamaño, no formar quistes musculares y por ser capaz de infestar aves.

Muchos investigadores fueron reacios a adoptar la nueva clasificación propuesta por Britov y Boev, como Bessonov y col. (1975), Machnicka (1979) ; Dick & Belosevic (1978) ; Belosevic & Dick (1979, 1980b) ; Dick & Chadee (1981, 1983) quienes consideraban que solo existiría una especie, dándoles al resto la categoría de variantes o subespecies. Y es que la evidencia de su existencia estaba basada en experimentos en los que aislados naturales no se podían entrecruzar con *T. spiralis* y en la resistencia a la congelación de *T. nativa*. (Berezancev & Krajnjnaja, 1981; Shaikenov y col., 1977; Jahontov, 1981; Koval'chuk, 1981).

La gran confusión creada dentro de este género es consecuencia, en gran medida, de las grandes similitudes morfológicas que existen dentro de sus componentes, lo que ha llevado a que los criterios de clasificación

taxonómica se apoyen en otras variables como tipo de hospedador, pruebas de entrecruzamiento, distribución geográfica, resistencia de las larvas a la congelación, polimorfismo isoenzimático y datos de secuenciación de ADN.

En 1989 se añadieron a las cuatro especies descritas, tres nuevos grupos de categoría taxonómica incierta (Pozio y col, 1989a, b, c y d), *Trichinella* T3, *Trichinella* T5, *Trichinella* T6. Los aislamientos europeos y africanos de *T.nelsoni* mostraban aspectos significativamente diferentes, tanto a nivel clínico como genético y zoogeográfico, lo que hizo considerar que ambos tipos de aislamientos europeos y africanos debían ser distintos; por ello posteriormente se estableció una nueva clasificación de forma que pasaban a englobarse en el grupo T3 las especies europeas de *T.nelsoni*, mientras que *T.nelsoni* (T7) quedaba reducida a los aislamientos africanos (La Rosa y col., 1991). Posteriormente propusieron un nuevo grupo T8 correspondiente a los aislados sudafricanos. (Pozio, La Rosa y Verster, 1991).

En 1992, La Rosa y col. analizaron un gran número de aislados procedentes de los cinco continentes, confirmando la existencia de 8 grupos genéticos. Pozio y col. (1992b) utilizando un análisis de datos genéticos, biológicos y bioquímicos propusieron la existencia de 5 especies y 3 fenotipos adicionales de categoría taxonómica incierta, proponiendo finalmente la categoría de especie para *Trichinella* T3, que ha pasado a denominarse como *T.britovi* (Pozio y col., 1992a)

Y aunque esta nomenclatura ha sido adoptada por numerosos autores (Murrell, 1991 ; Bolás & Wakelin, 1992 ; Snyder y col., 1993 ; Zarlenga & Murrell, 1993 ; Dea y col., 1994 ; Lichtenfels y col., 1994 ; Minchella y col.,

1994, Rodríguez y Gárate, 1994 ; Arribas y col., 1994, etc...) , otros autores sin embargo siguen considerando al género compuesto por dos especies *T.spiralis* y *T.pseudospiralis* (Bessonov, 1996) o por cuatro especies (*T.spiralis*, *T.nativa*, *T.nelsoni* y *T.pseudospiralis* (Shaikenov, 1994, 1995).

A continuación describiremos brevemente las características de cada una de las especies propuestas según Pozio y La Rosa.

➤ ***TRICHINELLA SPIRALIS* SENSU STRICTO (T1)**

Es el agente etiológico de la triquinelosis doméstica y presenta una distribución cosmopolita. Su ciclo epidemiológico puede ser mantenido entre hospedadores domésticos (por ejemplo cerdo-cerdo), doméstico y sinantrópico (cerdo-rata), doméstico y silvestre (cerdo-zorro), sinantrópico y silvestre (rata-zorro) y entre hospedadores silvestres (zorro-zorro). La principal fuente de infestación para el hombre son los cerdos domésticos y los jabalíes, y ocasionalmente la carne de oso, caballo y zorro. No resiste la congelación y presenta un alto índice de capacidad reproductora (ICR) en ratas, ratones y cerdos. Esta especie es altamente patógena para el hombre.

➤ ***TRICHINELLA NATIVA* (T2)**

Es el agente etiológico de la triquinosi silvestre en las regiones árticas y subárticas de la región Holártica. La frontera de distribución en el sur está influenciada por la temperatura ambiente durante la estación fría, y parece corresponder con la isoterma -5°C, en enero. Los hospedadores más habituales de este parásito pertenecen a las familias *Canidae*, *Felinae*,

Mustelidae, Ursidae y Odobenidae. De ellos, el oso polar parece jugar un importante papel como reservorio en la región ártica. La patogenicidad en humanos varía de moderada a severa, caracterizándose la infestación por un largo período de incubación y una sintomatología intestinal severa. La principal fuente de infestación para el hombre es el consumo de carne de oso y de foca. Biológicamente se caracterizan por presentar un bajo ICR en cerdos y animales de experimentación y alta resistencia a la congelación. La importación de animales infestados por esta especie puede representar una nueva fuente de infestación en países donde no existían previamente este tipo de parásitos resistentes a la congelación.

➤ ***TRICHINELLA BRITOEI* (T3)**

Es el agente etiológico de la triquinelosis silvestre del área templada de la región Paleártica. La frontera norte de distribución está influenciado por la temperatura durante la estación fría que correspondería con la isoterma de -6°C en enero. Entre las isotermas -5° y -6°C viven sinantrópicamente con T2, detectándose incluso infestaciones concurrentes en un mismo animal de ambas especies (Pozio y col., 1995). La frontera sur está establecida en Asia, mientras que en Africa parece ser la región del Sahara. Más recientemente ha sido detectada en la isla de Honshu en Japón (Pozio y col., 1996). Los científicos soviéticos la siguen considerando como *T.nelsoni*. Los principales reservorios son el zorro (*Vulpes vulpes*), el chacal (*Canis aureus*) y el lobo (*Canis lupus*), aunque también parece infestar a jabalíes, caballos, cerdos de montanera y solo en ciertas circunstancias, a ratas. La sintomatología en el hombre se caracteriza por un largo período de incubación y ausencia de signos y síntomas intestinales. No se han descrito casos fatales.

➤ **TRICHINELLA PSEUDOSPIRALIS (T4)**

Es el agente etiológico de la triquinelosis de las aves. Muestra una distribución cosmopolita en las regiones Paleártica, Neártica y Oceanía. Se han encontrado en aves de presa, omnívoros y mamíferos de los ordenes *Marsupialia*, *Rodentia* y *Carnivora*. La principal característica biológica es la ausencia de la célula nodriza alrededor de la larva muscular y un amplio espectro de hospedadores debido a su capacidad de sobrevivir a temperaturas entre 36 y 42° C. Su ICR es inferior en cerdos y otras especies salvajes que en ratas y ratones. El primer caso diagnosticado en humanos es el recogido por Ainsworth y col. (1994) y Andrews y col. (1994) en una paciente de Nueva Zelanda; desde entonces se han recogido nuevos casos en Tailandia (Pozio y col., 1997b) y Nueva Zelanda (Bessonov, 1997).

➤ **TRICHINELLA T5**

Es el agente etiológico de la triquinelosis en las áreas templadas de la región Neártica. Se han examinado muy pocos aislados y sus fronteras sur y norte de distribución aún son desconocidas. Presenta unas características biológicas, epidemiológicas y bioquímicas muy similares a T3, por lo que Pozio & La Rosa (1997), la consideran el equivalente a dicha especie en América del Norte. Su característica biológica principal es su bajo índice reproductivo en ratones de laboratorio y el no ser resistente a la congelación. En Pennsylvania e Indiana como reservorios, aparecen el oso (*Ursus americanus*), coyote (*Canis latrans*), zorro rojo (*Vulpes vulpes*), mapache (*Procyon lotor*) y el visón (*Mustela vison*). Se desconocen casos de infestación en el hombre, aunque probablemente algunos brotes de

triquinelosis humana en EE.UU. se hayan producido por el consumo de carne de animales salvajes infestados por T5.

➤ **TRICHINELLA T6**

Es el agente etiológico de la triquinelosis silvestre en las áreas templadas septentrionales de la región Neártica. Se han analizado muy pocos aislamientos y tampoco se conoce su distribución, al igual que en el caso anterior. Sus características biológicas, epidemiológicas y bioquímicas son intermedias entre T2 y T5. Se caracteriza por una resistencia a la congelación inferior a T2, pero superior a la del resto de las especies. Se ha encontrado en oso (*Ursus arctos horribilis*), puma (*Felis concolor*), carcaiyú (*Gulo luscus*), lobo (*Canis lupus*) y zorro gris (*Urocyon cinereoargenteus*). Pozio & La Rosa (1997) afirman que se distribuiría por las Montañas Rocosas y los Montes Apalaches (EE.UU.). Se desconocen casos de infestación en el hombre, aunque probablemente algunos casos de triquinelosis humana en EE.UU. se hayan producido por el consumo de carne de animales salvajes infestados por T6.

➤ **TRICHINELLA NELSONI (T7)**

Es el agente etiológico de la triquinelosis silvestre en el Africa ecuatorial. Se dispone de un número muy reducido de aislamientos, y los primeros estudios epidemiológicos sobre este parásito fueron realizados por el equipo de Nelson. Biológicamente se caracteriza por su baja patogenicidad para hombres y animales, un tiempo de desarrollo de la célula nodriza bastante extenso (entre 34 y 60 días p.i.) y por no resistir la congelación. Se han recogido unos 100 casos en humanos en Kenia, Tanzania, Senegal y Etiopia.

➤ **TRICHINELLA T8**

Es el agente etiológico de la triquinelosis en Sudáfrica. Solo se dispone de tres aislados procedentes de la República Sudafricana y de Namibia. Se desconocen casos en humanos. Sus principales características biológicas y bioquímicas son muy similares a T3 y T8. Dicha similitud ha hecho especular a Pozio & La Rosa (1996) sobre la posibilidad de que *Trichinella* T8 hubiera sido importado desde Europa hasta África del Sur en los siglos XVI y XVII, durante la colonización de los Boers y que como consecuencia de la presión selectiva ejercida por las condiciones climáticas, habría podido favorecerse el desarrollo de este genotipo en las regiones subtropicales del hemisferio sur.

VI. RESPUESTA INMUNE

Trichinella spiralis es un parásito capaz de establecerse, desarrollarse y reproducirse en una amplia gama de hospedadores vertebrados. Esta baja especificidad de hospedador implica que dicho organismo tiene la capacidad de adaptarse a una gran variedad de condiciones, con lo que apenas son afectados por aquellos aspectos de la inmunidad natural que imponen una especificidad más rígida en otras especies. Sin embargo, tienen en común con todos los metazoos parásitos el inducir en el hospedador una fuerte respuesta inmune. La complejidad del estímulo se debe, no solo a la diversidad de antígenos presentes, sino también al hecho de que estos antígenos pueden mostrar especificidad de estado, cambiando cuali- y cuantitativamente durante el ciclo biológico y liberándose en diferentes tejidos del hospedador. Muchos componentes de la respuesta inmune probablemente tienen poco o ningún efecto sobre el parásito o el hospedador, pero pueden ser útiles para el diagnóstico, algunos son capaces de dañar al parásito e inducen una respuesta protectora contra nuevas infecciones, mientras que otros son dañinos para el propio hospedador. (Wakelin & Denham, 1983).

En 1931 McCoy ya demostró que tras una infestación inicial las ratas empleadas desarrollaban resistencia a una segunda infestación. Culbertson & Kaplan (1938) probaron que se producía transferencia artificial de la inmunidad con el suero de conejos infestados inoculado a ratones, y posteriormente Culbertson en 1943 demostró que había una transferencia pasiva y natural de dicha resistencia, de ratas infestadas a las crías, durante la lactancia (Kagan, 1960).

Los primeros test *in vitro* que permitían detectar anticuerpos, por incubación de larvas de *Trichinella* con el antisuero, fueron introducidos por Oliver-Gonzalez en 1940. Este autor encontró anticuerpos frente a los adultos entre 15 y 50 días después de la infestación y contra la forma larvaria entre 30 y 120 días después. Aunque fue Melcher (1943) el primero en fraccionar la larva de *T.spiralis* para usarla como antígenos en pruebas serológicas e inmumológicas (Kagan, 1960).

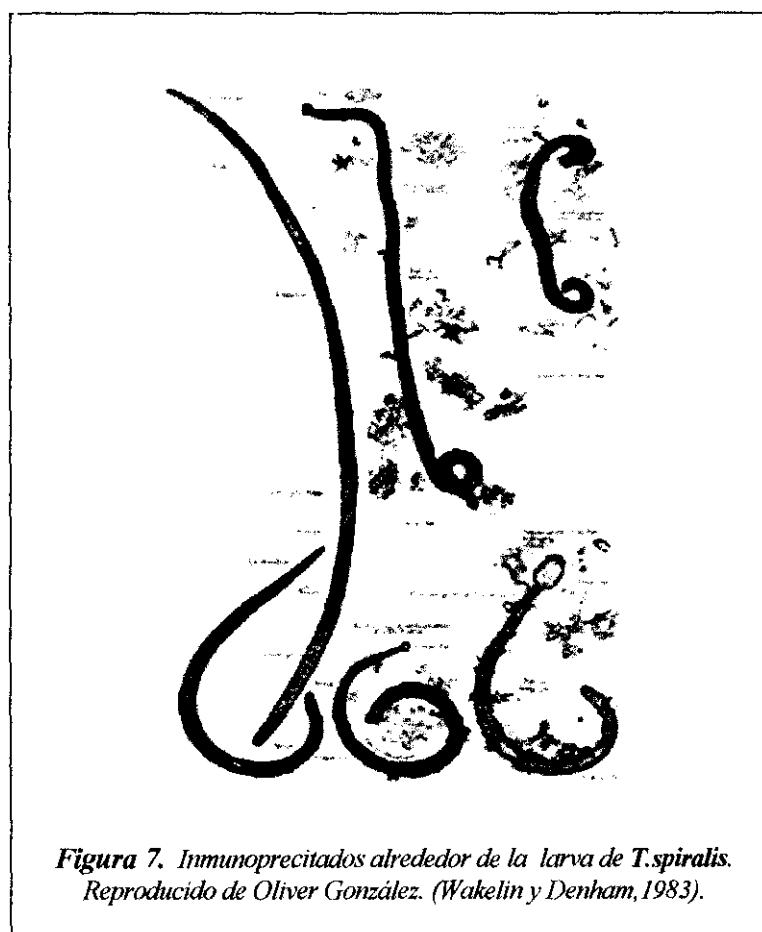


Figura 7. Inmunoprecitados alrededor de la larva de *T.spiralis*.
Reproducido de Oliver González. (Wakelin y Denham, 1983).

6.1. ANTÍGENOS

La presencia de un parásito en un hospedador inevitablemente va a inducir en éste una respuesta inmune frente a los cientos o miles de macromoléculas antigénicas producidas por el parásito. La importancia, por tanto, de los antígenos parasitarios radica, por un lado, en la función que dichos antígenos tienen para la defensa del parásito y por otro, en la respuesta que van a inducir en el hospedador parasitado (Anders y col., 1982).

Si bien, en principio, parecen los antígenos de superficie los más interesantes, puesto que pueden ser fundamentales en la fisiología del parásito (por ejemplo en el intercambio de nutrientes) y a la vez actuar como excelentes dianas para los elementos neutralizantes movilizados por el sistema inmune, se ha observado sin embargo, que los antígenos internos pueden ser expresados en la superficie de las células del hospedador y actuar así como dianas efectivas para desencadenar la respuesta de los linfocitos T (Townsend y col., 1986), por ello habría que tener en cuenta estos antígenos citoplasmáticos o somáticos que forman parte de los parásitos. Por último, hay que recordar aquellos antígenos que son secretados, liberados o excretados por los parásitos (Lightowlers & Richard, 1988), y que podrían encargarse de la defensa del parásito al bloquear el sistema inmune del hospedador.

6.1.1. ANTÍGENOS DE LA CUTÍCULA

La superficie de los nematodos difiere de la del resto de los helmintos porque posee una gruesa cutícula extracelular externa a la membrana plasmática de la hipodermis. Aunque la cutícula es rica en colágenos estructurales, generalmente no están expuestos al sistema inmune del

hospedador, y por ello los estudios se han centrado en los componentes de naturaleza no colágena de la epicutícula, cubierta que recubre superficialmente a estos parásitos.

La cutícula, por ser un punto de contacto entre parásito y hospedador, es potencialmente antigénica y por ello ha sido tratada con especial atención. Esta estructura parecía en un principio inerte, sin embargo hoy se sabe que es dinámica, especialmente respecto de los cambios estructurales entre estadios e incluso dentro de un mismo estadio, cambios que pueden ser cruciales para la supervivencia del parásito. La organización molecular de la cutícula de *Trichinella* es un factor importante en la elucidación de la relación hospedador-parasito. (Ortega Pierres y col., 1984).

Las evidencias de que el hospedador sintetiza anticuerpos frente a distintos componentes de la cutícula se pusieron de manifiesto, en un primer momento, empleando el parásito entero y aplicando técnicas como la inmunofluorescencia indirecta (Sulzer, 1965 ; Crandall & Crandall, 1972) ; microscopia electrónica y conjugados marcados con ferritina (Despommier y col., 1967) . Kim & Ledbetter (1981) usando microscopia electrónica de barrido consiguieron visualizar precipitados de anticuerpos distribuidos sobre la cutícula, tanto en L1 como en adultos.

Posteriormente Phillip y col. (1980,1981) fueron capaces de marcar las proteínas de superficie del gusano con ^{125}I , disolver a continuación la cutícula en un tampón que contenía un 2% de deoxycolato, y precipitar los antígenos con suero de rata inmune ; la electroforesis en SDS-PAGE de los precipitados seguido de autoradiografía revelaba un número de antígenos estado-específicos. Los embriones mostraban 4 antígenos de peso molecular

aparente 28, 30, 58 y 64 kDa ; y las larvas L1 mostraba también 4 antígenos pero con PM 47, 55, 90 y 105 kDa, de los cuales, los de 55 y 105 tenían una porción carbohidratada, caracterizada por unirse a lectina de lentejas. Otro grupo de antígenos fue identificado en la cutícula de la larvas L2-L4 con pesos de 20, 33, 40 y 56 kDa. Este último antígeno de 56 kDa se determinó que era distinto del de 55 kDa de la L1. Además, solo los tres antígenos de bajo PM presentes en la L4 se encontraban también sobre la superficie del adulto. Los autores también observaron que los antígenos de superficie marcados eran secretados al medio de cultivo por los gusanos, es decir, en los productos de E/S había antígenos desprendidos de la cutícula.

Estos resultados corroboraban la hipótesis "dual-antibody", sugerida 40 años antes por Oliver-Gonzalez, (1941) quien sospechaba de la existencia de antígenos en la cutícula estado-específicos.

Parkhouse & Ortega-Pierres (1984) utilizando esta misma técnica, observaron que en condiciones reductoras, los componentes marcados para L1 eran 4 y tenían los mismos PM que los de los autores anteriores; mientras que, en el caso de los embriones y adultos eran ligeramente diferentes : 64, 58, 34 30 y 40, 33, 20, respectivamente. En condiciones no reductoras se observaba un campo continuo entre 100 y 1000 kDa, además de la de 55 y 105 para las larvas L1. En el caso de los embriones eran de 120, 60, 34 y 32 y finalmente, los adultos mantenían las moléculas de 30 y 60 kDa. De estos datos deducían que la superficie de la larva estaba formada por un conjunto de agregados de 50 a 1000 kDa, constituidos de subunidades de 47 y 90 kDa. En el adulto aparecía un complejo de 60, formado por la interacción entre las moléculas de 40 y 20 kDa. Y en los embriones había dímeros homólogos similares de 58 kDa.

Además en el caso de los embriones, Mackenzie y col., (1978), habían indicado que existían cambios intramudas, de forma que los embriones mantenidos en cultivo durante una noche presentaban un mayor tamaño que cuando eran liberados por las hembras. Además observaron que algunos de estos embriones eran capaces de activar el complemento, en concreto esta activación se debía a una banda presente en la región media de la cutícula, pero no a la totalidad de la misma, fenómeno, por el contrario, que no se producía en el caso de los embriones recién puestos. Es decir, se habían producido cambios moleculares sobre la superficie de los embriones. Estos cambios fueron analizados posteriormente por Jungery y col., (1983). Estos autores empleando también radiomarcaje, detectaban un solo componente de 64 kDa, en aquellos embriones recogidos directamente tras 30 minutos de incubación de los adultos, y aquellos que posteriormente se habían mantenido en cultivo 2,5 ó 6,5 horas. Mientras que en los mantenidos tras 17,5 horas o toda la noche, aparecían tres bandas adicionales de 58, 34 y 32 kDa, es decir aparecían entre 6-18 horas después de la puesta de embriones.

El empleo de monoclonales también ha resultado útil para caracterizar la presencia de antígenos en la cutícula, así Ortega Pierres y col., (1984a) prepararon 6 anticuerpos monoclonales (NIM-M1 a NIM-M6), que resumimos en el esquema siguiente :

Anticuerpos monoclonales					
Estadio	PM de Ag de superficie	Liberación "In vitro"	Nombre	Especificidad	Tiñen superficie
L1	105,90,55,47	55,47	NIM-M1	105,90,57,47	+
			NIM-M2	90,47	—
Adultos	40,33,20,	40,20	NIM-M3	40,20	+
			NIM-M4	40,20	—
Embriones	64,58,34,30	64	NIM-M5	64	+
			NIM-M6	64	—

Observaban que los monoclonales NIM-M5 y NIM-M6 reaccionaban con el componente de 64 kDa solubilizado del embrión, sin embargo el primero es capaz de reaccionar con la superficie del gusano *in vivo*, mientras que el segundo no. Además, a medida que los embriones se dejan en periodos más largos de cultivo van expresando nuevas proteínas de 58, 34 y 30 kDa, aunque va fallando el reconocimiento del gusano vivo por el NIM-M5, es decir, se ha formado un anticuerpo frente a un epitopo que solo ha estado presente durante 6–8 horas, tiempo tras el cual ha quedado enmascarado por la presencia de otras moléculas. Para determinar como era posible que el sistema inmune reconociera y expresara anticuerpos frente a fracciones no expuestas de proteínas de superficie, marcaron gusanos *in vivo*, manteniéndolos en cultivo. En los tres estadios se producía la liberación de los componentes de superficie, es decir, este recambio de componentes de la superficie podía ser un mecanismo que permitiera al sistema inmune procesar y reconocer epitopos antigénicos, normalmente escondidos en el gusano intacto.

Por otro lado, el que un mismo monoclonal NIM-M 1 reconozca los 4 antígenos de superficie de L1 indica que comparten secuencias polipeptídicas comunes. Por análisis peptídico determinaron que las de 105 y 90 kDa eran dímeros de la de 55 y la de 47 kDa, y que todas procedían de un solo gen, de forma que el producto se podría incorporar a la superficie como un monómero o como un dímero, ya fuera en forma glicosilada o no. Teniendo en cuenta que las proteínas que se unen a lectinas de lentejas forman agregados de alto peso molecular y se pueden unir a través de puentes disulfuro (Clark y col., 1982), el conjunto de las diferentes formas moleculares que componen el antígeno principal de superficie de la L1, podría provenir de una molécula precursora que sería procesada por tres mecanismos bioquímicos: dimerización, glicosilación variable y polimerización dependiente de puentes disulfuro.

Por otro lado, el NIM-M2 reconocía solo los componentes que se unen a las lectinas, es decir que reconocía un epitopo carbohidratado, y además el hecho de que no hubiera tinción de la superficie, podría ser indicativo de que la parte glucídica no quedaría expuesta en la superficie del parásito.

También con el empleo del monoclonal NIM-M7 (Ortega-Pierres y col., 1986) observaron que reaccionaba solo con la bolsa copulatriz de los machos adultos vivos y muy ligeramente con otras áreas de la superficie de machos y hembras. Esto podría indicar, por tanto, diferencias moleculares entre la organización de los antígenos de superficie, es decir, esta especialización regional demuestra que la cutícula de los nematodos no es químicamente uniforme.

Grencis y col., (1986) separaron grandes cantidades de antígenos de superficie de la larva, en una forma relativamente pura, aplicando un detergente catiónico llamado CTAB que actuaba selectivamente sobre las proteínas de la cutícula. El tratamiento con este detergente durante un período aproximado de una hora no dañaba a los gusanos y aún mantenían antígenos protectivos capaces de estimular la inmunidad. Además, el preparado antigénico de CTAB era capaz de proteger a los ratones frente a una infestación experimental, como se deducía por la reducción de la carga intestinal parasitaria, fecundidad y longitud de los gusanos y carga parasitaria en la fase muscular.

McLaren y col., (1987) empleando los monoclonales preparados por Ortega-Pierres demostraron que los antígenos responsables de conferir protección contra la triquinosis *in vivo*, estaban localizados en el esticosoma y en la epicutícula de la larva L 1 y que los antígenos del esticosoma puede ser compartidos por diferentes estadios. Empleando técnicas más sensibles de tinción, como la de oro coloidal, detectaron que también había compuestos antigénicos en las capas más internas de la cutícula, y en la superficie del intestino, pero no en la del esófago.

Takahashi y col., (1988,1990a) amplía los anteriores resultados mediante estudios de inmunohistoquímica revelando la presencia de un único perfil de epitopos antigénicos sobre la superficie de la cutícula de la larva muscular, epitopos que también están internamente localizados en los gránulos- α de los esticocitos y en la sustancia que ocupa el esófago, es decir, presentan una antigenicidad común. Parece que, dado que los gránulos de los esticocitos son secretados al exterior a través del esófago, es probable que esta sustancia que ocupa el esofago (ESO) sea un remanente de tales

gránulos, y la cutícula adsorba el contenido de los mismos, proporcionando la modificación antigénica de la superficie. En este estudio por tanto, se confirmaba la evidencia de que estos gránulos- α eran la fuente principal de tales antígenos de la superficie cuticular, mientras que los gránulos- β jugarían un papel menor o nulo.

Otros autores han corroborado el papel protector de los antígenos de superficie, así Crawford y col., (1986) al inmunizar animales con el homogenado o con los antígenos de superficie apreciaban que, aunque no se veía afectado al establecimiento del parásito en el intestino, a 6 días p.i. sin embargo se producía una reducción del 75 y 60% en cada caso. Vacunación que, por otro lado, era menos eficaz que la conseguida con una infestación previa.

También los antígenos aislados mediante columnas de afinidad parecen conferir protección. Ortega Pierres y col., (1989) conseguía protección frente a *Trichinella* con los antígenos aislados con el monoclonal NIM-M1 reduciéndose, tanto la carga parasitaria intestinal como el número de larvas musculares. Es decir, a pesar de la especificidad de estado, los antígenos de la larva inducían protección frente a la fase intestinal. Los estudios de inmunohistoquímica determinaron además que estos antígenos son compartidos entre la superficie y el esticosoma. Aunque los antígenos de superficie están ausentes en la superficie del adulto, sin embargo, se encuentran pequeñas cantidades en el esticosoma residual y en el intestino del adulto (McLaren y col., 1987). Este material podría actuar quizá como un foco para una eventual respuesta inmune protectora, o bien que los antígenos activen a las células T para que participen en procesos inflamatorios no específicos, lo que explicaría que dichas proteínas específicas de estado y

purificadas, en este caso las de larvas L1, puedan provocar la eliminación de otro estado (el adulto).

Además se han empleado con fines diagnóstico los antígenos de superficie/esticosoma que junto con los de E/S se muestran más específicos que los extractos totales de la larva. (Gamble y col., 1983 ; Murrell y col., 1986 ; Gamble y col., 1988 ; Arriaga y col., 1991 ; Ortega-Pierres, 1995).

6.1.2. ANTÍGENOS DE EXCRECIÓN/SECRECIÓN

La primera evidencia de que los productos de ES de varios estadios de *Trichinella* contenían antígenos se obtuvieron de experimentos en los cuales se observaban precipitados en los poros anales, genitales y orales de gusanos incubados en suero inmune (Oliver González, 1940), en este primer estudio se observó que los precipitados aparecían en las bocas de la L1 y en las bocas, anos y vulvas de las hembras adultas.

Evidencias directas de la naturaleza protectora de los antígenos de ES fueron detectadas posteriormente por Thorson (1951,1953), para *N.muris*, y más tarde se obtuvieron similares resultados con los de la L1 de *Trichinella*, (Campbell, 1955) ; donde dicha inmunidad se puso de manifiesto por la rápida eliminación de los adultos del intestino, la falta de crecimiento de las hembras adultas y una reducción en el número de larvas maduras en el músculo. Chipman (1957) amplió estos estudios al gusano adulto, consiguiendo una reducción, aunque más ligera pero estadísticamente significativa del número de adultos y de larvas L1.

Ya en 1965, Mills & Kent determinaron parcialmente la composición de los productos de ES de las larvas L1 de *Trichinella*. Detectando la presencia tanto de proteínas como glicoproteínas, que se separaban en 4 fracciones, por cromatografía de intercambio iónico y 3 fracciones, en electroforesis en acetato de celulosa. La mayoría de estos antígenos eran estables a 56°, durante 1 hora. Sin embargo, Crandall & Zam (1968) resolvieron los productos de ES de L1 en un mínimo de 12 componentes, empleando una combinación de electroforesis en discos de poliacrilamida e inmunodifusión, apareciendo un mínimo de 7 arcos de precipitación.

Los antígenos de ES de otros estadios han sido menos estudiados. Berntzen (1974) consiguió desarrollar larvas L1 a adultos, en un medio con requerimientos específicos, recogiendo a continuación los productos de ES a 3, 12 y 20 h. y a 8 días. La inmunolectroforesis de estas muestras, usando suero de ratas infestadas en dos ocasiones, daba como resultado la aparición de 3 a 9 arcos de precipitación.

Al comparar los antígenos de ES de larva y adultos (Wakelin & Lloyd, 1976) observan que el patrón de la L1, no sólo es diferente del del adulto, sino que es más complejo. Es posible que unos pocos antígenos del adulto compartan identidad con alguno de los antígenos de la L1, sin embargo en este caso los sueros empleados eran los de conejos a los que se habían inmunizado 8 veces, con lo que era probable que muy pocos o ningún adulto se desarrollara totalmente en el intestino, con lo cual la mayor exposición de los animales era a los antígenos de la larva. Esto probablemente explica que entre los antígenos presentes en las secreciones de los adultos, se detectaran preferiblemente aquellos que compartieran identidad con los de la larva.

Posteriormente se han llevado a cabo estudios en geles de SDS-PAGE, sistema con el que se consigue una excelente resolución del rango de PM. Los productos de ES tanto de la L1 como de adultos tienen una composición protéica compleja. Hay sin embargo marcadas diferencias entre los estadios, en el rango de alto PM, destacando la ausencia de una banda en el patrón del adulto, equivalente a la de 45 kDa en la larva. De forma similar el patrón de la larva no tiene equivalente a la de 33 o de 120 kDa del adulto. Sin embargo, parece haber bastante similitudes en las proteínas de bajo PM (Silberstein, 1983).

El esticosoma es la fuente de antígenos de ES de la larva L1 y ha sido puesto de manifiesto por medio de la tinción de secciones de tejidos con anticuerpos marcados con enzimas o fluorocromo (Jackson, 1959 ; Crandall & Crandall, 1972 ; Despommier & Müller, 1976). El estudio de los antígenos de estos gránulos (Despommier & Müller, 1970, 1976) tiene varias ventajas sobre el estudio de los productos de ES o del extracto crudo homogenado. La centrifugación diferencial del homogenado de la L1 da una fracción P2 que está altamente enriquecida en los gránulos secretores, pero que también contiene fragmentos de mitocondria o de membrana. Cuando esta fracción es tratada con Triton X-100 al 2%, se consigue lisar los gránulos. El sobrenadante resultante se designa como la fracción S3, que por análisis de Ouchterlony contiene todos los antígenos asociados a un preparado de ES de L1. En un primer momento se detectaron dos tipos de gránulos en el esticosoma llamados α y β , y los antígenos contenidos en cada uno no presentan reacciones cruzadas. Actualmente y como ya se comentó en el apartado de descripción de la morfología del parásito se han detectado 4 tipos de gránulos. Se ha demostrado además que los antígenos de 50-55 kDa son secretados de los α -esticocitos que se disponen en la parte posterior del

esticosoma de la larva muscular, mientras que los antígenos de menor PM, es decir los de 48 kDa, están presentes en los β -esticocitos, localizados en la porción anterior del esticosoma (Silberstein & Despommier, 1984). No está claro si esta diferencia en la localización dentro del esticosoma procede de una diferencia estructural entre estos antígenos o refleja la existencia de una proteína precursora común que sufra un proceso post-traducciona, dentro de varias regiones del esticosoma. Además los embriones no presentan esticosoma o los antígenos secretores característicos, pero empiezan a formarlos después de invadir las células musculares (Gold y col., 1990).

La composición química de la fracción S3 ha sido descrita por Despommier & Laccetti (1981a). En geles SDS-PAGE se obtenían al menos 28 bandas, con un PM que oscilaba entre 11 a 200 kDa. Cuando se sometían a isoelectroenfoque se detectaban 37 bandas, de las cuales 22 eran positivas para carbohidratos. Las proteínas se concentraban en los puntos bajos del gradiente de pH. Tanto la fracción S3 como varias de sus subfracciones se comportan como fuertes inmunógenos protectivos. La fracción con mayor fuerza protectora es la de pI 4,3.

De los componentes de la fracción S3, 20 fueron identificados como antígenos por inmunolectroforesis e inmunolectroforesis cruzada. Despommier & Laccetti (1981b) fueron capaces de separar antígenos de los no antígenos, por cromatografía de inmunoafinidad. La preparación antigénica así obtenida se denominó como PAW ("pooled acid washes"), fracción que contenía inmunógenos fuertemente protectores. Por inmunolectroforesis se ha visto que todos los antígenos contenidos en el extracto crudo homogenado de la L1 y en los ES están también contenidos en la S3 y la PAW.

Cuando se recurre a la comparación de estos 4 componentes en un gel SDS-PAGE, se observa por un lado, un enriquecimiento de antígenos en los pasos sucesivos desde el extracto crudo al S3 y PAW, y por otro lado la similitud entre ES y PAW, con la presencia de una serie de bandas protéicas en ambas preparaciones que parecen tener el mismo peso molecular y la misma intensidad relativa.

Gamble, en 1985 estudió los productos de ES y su capacidad protectora, utilizando un anticuerpo monoclonal, el 7C2C5, que era capaz de reconocer un epitopo que está presente en 3 de las proteínas de ES con PM aparente de 45, 49 y 53 kDa en condiciones reductoras, antígenos que eran glicoproteínas, y estaban presentes en los esticocitos. Además este epitopo parece restringido a los productos secretores de la L1, ya que dicho monoclonal no se une a los de adultos ni a los de embriones. Además el conjunto de los antígenos de 49 y 53 kDa aislados (no se pudo separar por la columna de afinidad la de 45 kDa) consiguieron inducir protección frente a la infestación por vía oral, que se apreciaba por la aceleración de la expulsión de los gusanos adultos, y la reducción de la fecundidad de las hembras. Sin embargo, el autor considera que estas proteínas no coinciden con las descritas por Ortega-Pierres, que presentaban un peso molecular similar.

Otros autores han seguido en la línea de analizar el papel protector de los antígenos aislados, fundamentalmente para mejorar la sensibilidad de los métodos diagnósticos. Empleando columnas de cromatoforo, Despommier y col., (1990) aislaron una proteína a partir de los productos de ES de 43 kDa. Además y dado que esta proteína era detectada, no solo en los esticocitos- α y en la cutícula, sino también dentro del citoplasma y del nucleoplasma de la célula nodriza, a día 9 p.i., el autor proponía que esta

proteína, que es continuamente secretada durante la infestación, tendría un papel fundamental en el mantenimiento y rediferenciación de las células musculares infestadas. Posteriormente se amplió el estudio de esta proteína y de otras proteínas de 45–50 kDa, aisladas también de los productos de ES por el mismo método (Gold y col., 1990), sugiriendo los autores que la proteína de 43 correspondía a la de 48 descrita por Silverstein & Despommier (1984). Esta misma proteína ha sido también obtenida por técnicas de ADN recombinante, utilizando en este caso la técnica de PCR para la amplificación del ADN (Su y col., 1991). Estas proteínas presentan, al menos un epitopo que producían reacciones cruzadas entre ellas, y al menos otro no compartido. Sin embargo a pesar de ser glicoproteínas, difieren en su secuencia de aminoácido N-terminal, composición aminoacídica, coeficiente de extinción y pI. Además parece ser que, al eliminar la parte glucídica, se pierde el reconocimiento por parte de los anticuerpos de conejos, obtenidos bien tras una infestación natural o por inmunización con la proteína purificada. Sin embargo ambas proteínas se caracterizan por tener en común :

1. Dos grupos N-glucanos
2. El tamaño de los polipéptidos deglicosilados, que es muy similar (32 y 33 kDa)
3. Contener Cys y presentar un carbohidrato proximo al extremo N-terminal.

La tecnología de ADN recombinante ha permitido obtener una proteína de fusión denominada TsA-12, que presenta un alto grado de analogía con una proteína inmunodominante de 53 kDa, presente en los productos de ES de la larva, aunque se sabe que en los productos de ES, se encuentran proteínas de 45, 49 y 53 kDa con epitopos homólogos inmunodominantes. Sin embargo, los anticuerpos antiTSA-12 no se unían a Ts45 ni a Ts49, lo que podría deberse a que la región de la proteína de 53, a la que se unen los

anticuerpos TsA-12, se ha eliminado de las proteínas de 45 y 49 kDa, o bien que éstas sean producto del metabolismo de la Ts.53. También se ha observado que hay múltiples copias del gen que codifica la TsA-12, genes que no tienen por que ser 100% homólogos y así este grupo de proteínas de 45, 47 y 53 kDa relacionadas podrían ser codificadas por estos genes. Además, a través de los resultados de los Northern-blots, se observa que las secuencias del ARNm de la TsA-12 se transcriben, tanto en la larva como en el adulto, mientras que en los Western-blot, el determinante antigénico de la de 53 kDa o la propia proteína de 53 kDa, no se produce durante la fase adulta, lo que los autores explican porque al existir múltiples genes que codifican para la proteína TsA-12, pueden codificar alternativamente diferentes proteínas de 53 kDa, que son expresadas de distinta forma durante los distintos estadios del ciclo biológico del parásito. (Zarlenga & Gamble, 1990).

En esta misma línea Sugane & Matsuura (1990) caracterizaron un gen que codifica un polipéptido antigénico de 46 kDa, proteína que parece coincidir con la identificada por Silberstein & Despommier (1984), de 48 kDa.

Lee & Shivers (1987) apuntan que los cambios que ocurren cuando la fibra muscular pasa a ser una célula nodriza son debidos a las sustancias secretadas por el nematodo, que participarían en la reorganización de la misma, y que por tanto podrían estar relacionados con los genes reguladores presentes en el núcleo de la fibra muscular. Estos resultados parecían corroborarse en el trabajo de Lee y col., (1991), quienes con una serie de monoclonales que reconocen epitopos en los esticocitos, sobre la superficie de la cutícula, en la luz del esófago y en la luz del intestino de la larva enquistada, denominados 7C2C5 y 1H7, al igual que los sueros policlonales

reconocen epitopos en la cavidad ocupada por la larva, en el citoplasma de la célula nodriza y en el núcleo hipertrófico de la misma, pero no en el núcleo pequeño de la célula nodriza, en la pared quística ni en el músculo que le rodea. Sus resultados sugerían que el antígeno encontrado en los núcleos hipertróficos era originado en el esticosoma de la larva y que podía estar controlando la transcripción y/o la trasducción.

Ya en 1985, Pritchard había detectado por inmunohistoquímica la producción de antígenos por las larvas musculares enquistadas *in vivo*. Sin embargo, posteriormente Ko y col., (1992) consiguieron demostrar *in vivo*, que los productos de ES de la larva al ser inyectados directamente en el músculo podían inducir la reorganización de la célula muscular del hospedador, de forma que los núcleos se hacían hipertróficos y aumentaban su número de 2 hasta 50 o más. Sin embargo, estos mismos autores (Ko y col., 1994) encontraron que los epitopos que son específicos de los antígenos de ES, no se podían detectar en los núcleos hipertróficos de los músculos a los que se habían inyectado estos antígenos, pero si estaban presentes en los núcleos hipertróficos de las células nodrizas formadas por los gusanos a día 14 p.i. ; la posible explicación es la propia condición de parasitación, donde la fibra está continuamente en contacto con los materiales de ES, y por el contrario el núcleo de los músculos inyectados estaría solo expuesto a los antígenos de ES durante un breve período de tiempo, o bien que los métodos de detección empleados no fueran lo suficientemente sensibles.

Este posible papel de las proteínas de ES ha sido defendido por otros autores como Despommier y col., (1990) y Vassilatis y col., (1992), quienes llevaron a cabo el estudio de la proteína de 43 kDa presente en el grupo de las TSL-1, apoyándose en que en esta proteína, se detectaban dos hélices

fuertemente anfipáticas, que podrían conformar potencialmente un motivo “helix-loop-helix”, estructura que se ha encontrado en otras proteínas que están involucradas en el control génico muscular. Y aunque en el estudio por inmunocitlocalización, Vassilatis determinó la presencia de esta proteína, en el citoplasma y en el núcleo de las células musculares infestadas, y por tanto confirmaba el papel de la misma en el proceso de la formación de la célula nodriza; en trabajos posteriores el mismo autor (Vassilatis y col., 1996a) determinó que la glicoproteína era expresada por primera vez a día 11 tras el asentamiento muscular, es decir varios días después de que los cambios en la fibra muscular infestada se hubieran iniciado. Y por otro lado detectaba proteínas relacionadas inmunológicamente con la de 43 kDa, pero que no eran propiamente esta proteína, en el núcleo de la célula nodriza madura, llegando a la conclusión de que dicha proteína no estaba involucrada en la formación de la célula nodriza. Lo que parecía confirmarse por la presencia en *T.pseudospiralis*, especie no formadora de quistes, de una proteína relacionada con la de 43 kDa, que presentaba importantes similitudes en cuanto a su distribución en el músculo infestado (Vassilatis y col., 1996b). Aunque esta glicoproteína de 43 kDa se almacenaba en los α -estilocitos, sin embargo sería secretada rápidamente, tras la invasión de las células columnares epiteliales del intestino por la larva L1.

Jasmer y col., (1994) ya habían puesto en duda el papel de dicha glicoproteína en los fenómenos de transformación de la fibra muscular, ya que los antígenos reconocidos por los anticuerpos anti-p43 en el núcleo del hospedador, tenían distinta masa relativa al de los antígenos detectados por estos mismos anticuerpos en los productos de ES. La evidencia definitiva de que la p43 no se requiere para la inducción del fenotipo de célula infestada está basado en la incapacidad para detectar la proteína en las larvas irradiadas que

sin embargo, sí habían inducido en las células hospedadoras, las características típicas de las células infestadas, a pesar de que la irradiación de los embriones inhibe el posterior desarrollo de los esticocitos, incluyendo aquellos que producen esta proteína y por tanto pone en duda, no solo la participación de esta proteína, sino el de otras proteínas presentes en los esticocitos.

Aunque posteriormente trataremos con más detalle la cuestión de las glicoproteínas, hemos de mencionar en este apartado un conjunto de proteínas, específicas de las larvas musculares L1 y abundantes tanto en la superficie de la cutícula como en los productos de ES, que constituyen el grupo de antígenos TSL-1 (Appleton y col., 1991), caracterizado por compartir un epitopo carbohidratado inmunodominante (Denkers y col., 1990a, 1990b y 1991). La composición glucídica de esta familia de antígenos ha sido determinada por Wisniewski y col., (1993) ; Wassom y col., (1994) ; Reason y col., (1994) ; Probert y col., (1996) y Ellis y col., (1997), comprobando que el epitopo compartido por dichos antígenos presenta residuos terminales de tivelosa y más concretamente de β -tivelosa.

Resumimos a continuación los perfiles morfológicos e inmunológicos de los gránulos del esticosoma de la larva muscular y del adulto propuestos por Takahashi y col., (1992), quienes a tenor de sus resultados y comparaciones deducen por un lado, que solo los gránulos de tipo I del adulto comparten antígenos con los productos de ES de la larva, y por otro, que los diferentes perfiles antigénicos de los gránulos de tipo I y II del adulto pueden ser indicativos de una diferente funcionalidad.

TIPO DE GRANULO	TAMAÑO	TINCIÓN CON AZAN	INMUNOTINCION CON Mc TU1*	INMUNOTINCION CON Ac ANTI-ES #
ADULTO				
TIPO I	Redondo	Amarillo	—	+
TIPO II	Irregular	Amarillo	—	—
LARVA				
$\alpha 0 / \alpha 1$	Inclusión puntiaguda	Azul	+	+
$\alpha 2$	Inclusión redondeada	?	+	+
β	Inclusión redondeada	Roja	\pm	+
γ	Redonda	?	+	+

* TU1 es un anticuerpo monoclonal frente granulos α / superficie.

Los anticuerpos anti-ES fueron producidos en ratones C3H mediante inyección subcutanea de productos de ES de la larva.

6.1.3. ANTÍGENOS SOMÁTICOS

Los antígenos somáticos normalmente son moléculas muy conservadas y ampliamente distribuídas en la naturaleza y por lo tanto menos específicas y útiles para el inmunodiagnóstico que las de ES. Sin embargo, y a pesar de que tradicionalmente se le ha dado una mayor atención a los antígenos de superficie o de ES, hay que tener en cuenta que, una vez muerto el parásito, se presentan al hospedador múltiples antígenos somáticos y puede ocurrir que, alguno de estos antígenos o la respuesta inmune generada frente ellos,

sea responsable de reacciones patológicas importantes (Parkhouse & Harrison, 1989).

Aunque hayamos hablado anteriormente de la fracción S3, hemos de volver a hablar de ella ya que se obtiene del extracto crudo larvario. En este sentido, Despommier & Laccetti (1981a) caracterizaron la composición protéica de la fracción S3 mediante una columna cromatográfica, SDS-PAGE, isoelectroenfoque y tinción PAS. La mayoría de las proteínas constituyentes eran glicoproteínas con bajos puntos isoeléctricos. Algunas de las proteínas de alto peso molecular en SDS-PAGE se perdían pero, al ser tratadas con un agente reductor como el 2-mercaptoetanol, se observa que estas proteínas están constituidas por, al menos 2 subunidades unidas por puentes disulfuros. Había habido muchos estudios previos en los que se pretendía extraer y caracterizar los antígenos de la larva (Melcher 1943 ; Wodehouse 1956 ; Labzoffsky y col., 1959 ; Tanner & Gregory 1961 ; Barriga & Segre 1972 ; Beltran Hernandez y col. 1974 ; Sukhdeo & Meerovitch, 1979) ; sin embargo ninguno de estos estudios observaba un análisis detallado de las proteínas presentes. En este estudio la movilidad electroforética y la proporción relativa de los 20 antígenos fue determinada por medio de inmunolectroforesis cruzada e inmunolectroforesis, el punto isoeléctrico de cada antígeno se estimó por medio de isoelectroenfoque preparativo e inmunolectroforesis rocket.

Despommier y Laccetti (1981b) separaron de la anterior fracción una subfracción denominada PAW (fracción ácida) que coincidía con los 20 antígenos presentes en la S3 sin que, por el tratamiento adicional, se hubiera alterado la capacidad antigénica.

Cuando se intenta emplear la fracción S3 (Seaewright y col.,1983) en EIA, para la inmunodiagnosís de la triquinosis en cerdos infestados se observa que, si bien da valores más altos que cuando se emplea el extracto crudo, también aumenta el "background" y por tanto no se consigue una mejora en la técnica, mejora que sí se conseguía, por el contrario, con los antígenos de la subfracción PAW, obteniéndose no solo una mayor sensibilidad y especificidad, sino también una detección más temprana. Así Despommier en el "Simposio sobre diagnóstico y vacunas en las enfermedades parasitarias" (1985) considera este preparado antigénico útil para el uso de forma rutinaria en los mataderos.

Posteriormente Silberstein & Despommier (1984, 1985) mediante cromatografía de afinidad y usando anticuerpos monoclonales aislaron tres proteínas, una de las cuales, de 48 kDa, inducía un alto nivel de protección, constituyendo en su momento, el primer ejemplo de un antígeno derivado de un nematodo que confiere en el hospedador, un nivel de protección comparable al inducido por exposición a una infestación homóloga. Un segundo antígeno aislado (50/55kDa) también inducía protección, pero a un menor nivel que el de 48 kDa. Un tercer antígeno de 37 kDa, no producía protección, excepto a dosis elevadas. Mientras que las dos primeras estaban presentes en las secreciones y, en menor proporción en las fracciones S2 (citósica) y S3, (localizándose en los α -estíocitos la de 50-55 y en los β -estíocitos la de 48 kDa); la de 37 kDa por el contrario, está ausente de las secreciones y de la fracción S3 y representa el mayor componente de la S2, localizándose exclusivamente en el pseudoceloma.

Durham y col., (1984) consiguieron aislar mediante gel-filtración y por cromatografía de intercambio iónico, una fracción que designaron

como F1-b, que contenía una sola proteína de 45 kDa con pI aproximado de 5.1, demostrando además mediante el reactivo de Schiff que era una glicoproteína. Esta proteína además cuando se utilizaba en la inmunización de ratas poseía propiedades alergénicas e inducía una fuerte y rápida expulsión de los gusanos del intestino.

Parkhouse & Ortega-Pierres (1984), describen y comparan las proteínas somáticas presentes en los tres estadios del ciclo. Observando que, en los tres casos eran muy numerosas las glicoproteínas, y que al ser muchas de estas glicoproteínas estado-específicas podrían ser usadas como una alternativa para la preparación de antígeno con fines de inmunodiagnóstico. A pesar de las limitaciones del antígeno crudo en el diagnóstico, dado el elevado número de reacciones cruzadas con otros parásitos, sin embargo se ha mostrado útil en el diagnóstico de la enfermedad empleando Western-blot y la proteína de 109 kDa como marcador específico de *T.spiralis* (Ruangkunaporn y col., 1994 y Mahannop y col., 1995) con la ventaja adicional de ser detectado en las primeras fases de la enfermedad, frente al ES, que aunque es más específico usado en ELISA, no permite detectar la fase aguda, sin olvidar la facilidad y bajo coste de preparación.

En general, la descripción de los antígenos somáticos se suele realizar por comparación entre las proteínas presentes en extractos crudos u homogenados del parásito y las encontradas en los productos de ES. Así Su & Prestwood (1990,1991) purificaron, mediante cromatografía de afinidad y monoclonales también con fines diagnóstico, el extracto crudo larvario de *T.spiralis* observando que las proteínas de 49, 52 y 54 kDa eran más específicas frente a este parásito, mientras que las de 57-62 kDa eran menos específicas y que todas ellas eran glicoproteínas y aparecían en grandes

cantidades, tanto en los productos de ES como en el extracto bruto larvario. Las de 49, 52, 54, 60 y 62 kDa parecen ser similares a las de 45, 49, y 53 kDa descritas por Gamble & Graham (1984) y a los antígenos de 48 y 50–55 kDa descritos por Silberstein & Despommier (1984).

Herrera Esparza y col. (1987) detectaron en las proteínas solubles de *T. spiralis* sometidas a cromatografía de exclusión, 18 bandas en SDS–PAGE, de las cuales por inmunoblot identificaron 6 componentes antigénicos principales, tres de los cuales presentaban una fuerte reacción con los sueros de ratas infestadas (68, 59 y 45 kDa), mientras que ésta era más débil para los de 42, 33 y 28 kDa.

Un antígeno descrito únicamente en extracto crudo larvario es el reconocido por un anticuerpo monoclonal, 6B1, preparado por Zhu & Bell (1990), aunque inicialmente se había descrito que reconocía un doblete de 33 kDa en los productos de ES de la larva muscular, posteriormente se comprobó que reconocía una proteína de 45 kDa, presente únicamente en los extractos crudos y que, bajo condiciones reductoras, constaba de tres componentes de 32, 35 y 45 kDa , quedando encuadrados dentro del grupo TSL–7 (Appleton y col, 1991 ; Ortega–Pierres y col., 1996).

Ko & Yeung (1989) habían determinado que las proteínas de 45, 47, y 53 kDa del ES estaban también presentes en el extracto crudo en cantidades apreciables. Posteriormente, estos mismos autores (Ko & Yeung, 1991) ponen a punto un nuevo método empleando una columna rotatoria horizontal anfófila, con el fin de extraer directamente estos antígenos a partir del extracto crudo.

Robinson y col., (1991) empleando una amplia batería de monoclonales confirman que tres antígenos de 41, 46 y 55 kDa, purificados a partir del extracto crudo larvario, que parecían coincidir con los descritos por Gamble (1985) y Silverstein & Despommier (1984,1985) son reconocidos por ratones de diversas cepas al igual que por humanos infestados de forma natural. Añadiendo que el hospedador es capaz de reconocer los mismos antígenos principales, ya sea por la exposición de los mismos via infestación, o tras la inyección del homogenado de la larva.

Takahashi y col., (1994) realizaron un estudio de la localización inmunocitoquímica de los antígenos en gusanos adultos, observando que, al contrario de lo descrito en la larva muscular, carecen de antígenos sobre la superficie de la cutícula. Sin embargo, sí localizan sustancias antigénicas asociadas a los órganos reproductores, a pesar de ser estructuras cerradas, lo que podría estar relacionado con una de las manifestaciones de la inmunidad protectora, como es la reducción de la fecundidad. Finalmente los autores señalan que la localización de los antígenos de los adultos es similar a la de los antígenos que contienen fosforilcolina.

La fosforilcolina es una molécula que se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza. Su presencia en microorganismos y parásitos ha sido determinada por la reactividad de los extractos con las proteínas de los mielomas TEPC 15, MOPC 511 y MOPC 603, por la producción de anticuerpos anti-fosforilcolina en los hospedadores o por la reacción de las moléculas secretadas con AcM anti-fosforilcolina. Se ha encontrado en bacterias (Brundish & Baddiley, 1968), en hongos (Baldo y col., 1977) y en parásitos ; así en nemátodos se ha descrito, entre otros, en *Ascaris suum* (Crandall & Crandall, 1971) ; *Nippostrongylus brasiliensis* (Pèry y col., 1974)

Toxocara canis (Sugane & Ohima, 1983), *Trichuris suis* (Choy y col., 1991), *Anisakis simplex* (Iglesias y col., 1996) y en *Trichinella spiralis* (Ubeira y col., 1987a y b). Además de ser un hapteno muy abundante en la larva muscular y en el gusano adulto (Takahashi y col., 1993), es inmunodominante. Los antígenos de *T. spiralis* portadores del epítipo PC se encuentran englobados en los grupos TSL-4 y TSL-8 (Appleton y col., 1991). La ubicuidad de este hapteno da lugar a numerosas reacciones cruzadas que impiden su uso como reactivo de diagnóstico específico en las parasitosis, si bien se ha usado como marcador de algunas infestaciones parasitarias (Lal & Ottensen, 1989).

Almond & Parkhouse (1986a) por ELISA sobre (PC-BSA) detectaron anticuerpos anti-PC, del isotipo IgM, en ratones infestados. Ubeira y col., (1987b) estudiando la respuesta de células B productoras de anticuerpos anti-PC, durante el ciclo biológico del parásito, también detectaron una baja respuesta al igual que Crandall & Crandall (1971) y Brown & Crandall (1976), pero observaron, sin embargo que ésta aumentaba significativamente después de destruir las larvas musculares con el antihelmíntico mebendazol, demostrando la existencia de PC en este parásito. Estos mismos autores por centrifugación diferencial de las larvas musculares homogenizadas, obtuvieron una fracción microsomal rica en PC a la que denominaron FCp. Posteriormente Leiro y col., (1988) demostraron que este antígeno posee naturaleza T-dependiente, induce la producción de un alto nivel de células productoras de IgM y no genera células productoras de IgG, ni en la respuesta secundaria.

6.1.4. GLICOPROTEÍNAS

Las glicoproteínas se definen como polímeros formados por aminoácidos y residuos azucarados unidos entre sí covalentemente, de los que se sabe además que están presentes en numerosas formas de vida (Montgomery, 1970). Entre los parásitos se incluyen por ejemplo el fosfoinositolglicano de la glicoproteína de superficie VSG de *Trypanosoma* (Ferguson & Homans, 1988), los antígenos CCA y CAA de *Schistosoma* (Dunne, 1990) o el oligosacárido presente en la superficie y los productos de excrección-secreción de *Toxocara canis* (Maizels y col., 1987).

Aunque muchas de las proteínas de *Trichinella spiralis*, especialmente de la larva L1, se habían caracterizado como glicoproteínas y han sido mencionadas anteriormente :

- En los antígenos de superficie, el grupo de 105, 90,55 y 47 kDa descritas por Parkhouse y col., (1981) ; Clark y col., (1982) ; Parkhouse & Ortega-Pierres, (1984) ; Ortega-Pierres y col. (1984a, 1986) y MacLaren y col., (1987).
- En los de ES, como las de 50-55 y 48 kDa, aisladas de la fracción enriquecida en los granulos secretores, S3 por Silberstein & Despomier (1984), o las de 43 y 45-50 kDa, aisladas directamente de los productos de ES por Gold y col., (1990).
- En los somáticos, como los descritos por Parkhouse & Ortega-Pierres (1984), que además eran estado-específicas.

El papel de la parte glucídica adquirió verdadera importancia cuando se comprobó que ésta formaba parte del epitopo inmunodominante presente en

el grupo más importante de antígenos de *Trichinella*., el TSL-1. A continuación resumimos una serie de trabajos enfocados fundamentalmente hacia el papel de las glicoproteínas como antígenos y que han culminado con la reciente descripción de un azúcar, poco frecuente en la naturaleza, como parte del epitopo compartido por dicho grupo de antígenos.

Denkers y col., (1990a, 1990b, y 1991) realizaron una serie de estudios en los que analizaron mediante inmunoblot los antígenos presentes en el extracto bruto larvario, en las proteínas de superficie y en las de ES, encontrando una respuesta de anticuerpos bifásica, en base a la cual diferenciaban dos grupos de antígenos somáticos que definían como grupo I, detectado a los 13 días p.i. y grupo II, que era detectado a día 35 p.i. es decir cuando las larvas ya se habían establecido en músculo. Asignando dentro de este último grupo, a las proteínas de la cutícula y de ES, ya que eran reconocidas más tardíamente por los anticuerpos. Estos autores además señalan que este grupo antigénico II, comparte un epitopo carbohidratado inmunodominante, que constituye el 3-6 % de las proteínas presentes en el homogenado de la larva L1 y que queda restringido únicamente a este estadio del parásito. Cuando este grupo de proteínas fue analizado por electroforesis bidimensional (IEF/SDS-PAGE) se determinó que estaba constituido por 6 proteínas principales, dentro del rango de pesos moleculares de 43-68 kDa y de pI 5.0-6.3 ; además todas ellas reaccionaban con un anticuerpo monoclonal designado como Tsp 130. Cuando el análisis se llevaba a cabo por SDS-PAGE monodimensional, este grupo II se resolvía en 6 bandas de pesos 43, 47, 54, 57, 63 y 68 kDa, bajo condiciones reducidas, mientras que bajo condiciones no reductoras estaban constituidas únicamente por tres bandas principales de pesos 166, 158 y 141 kDa., que continuaban reaccionando con el monoclonal y que al ser extraídas del gel, reducidas y

electroforeadas nuevamente, se resolvían como dos bandas de 63 y de 68 kDa, es decir que en condiciones no reductoras, se comportaban como heterodímeros. Este grupo II probablemente incluiría alguno de los antígenos caracterizados por otros autores como los de 48 y 50-55 kDa, descritos por Silberstein & Despommier (1984, 1985) y los de 45, 49 y 53 kDa descritos por Gamble (1985).

Posteriormente determinaron que este grupo de proteínas estaban glicosiladas, por lo que hicieron dos tipos de tratamientos :

- Tratamiento químico con TFMS (ácido trifluorometanosulfónico) como agente deglicosilante, observando, por un lado la variación en el peso molecular y por otro, que los antígenos nativos y no los tratados con TFMS eran oxidados con peryodato y que además, solo las proteínas nativas reaccionaban con el monoclonal Tsp 130. Los oligosacáridos liberados de este grupo de proteínas eran capaces, además de bloquear dicho monoclonal en un ELISA de competición, lo cual no ocurría cuando se empleaban otros monosacáridos como fucosa, galactosa, N-acetil-D-galactosamina, N-acetil-ácido glucurónico, glucosamina, ácido N-acetilneuramínico, manosa y xilosa.
- Tratamiento enzimático con N-glicanasa, para eliminar los N-glicanos, observando una disminución en el peso molecular, pero se mantenía la reactividad con el monoclonal. Sin embargo este tratamiento daba lugar a una molécula de 36 kDa que carecía del epítipo inmunodominante. Los antígenos que resistían la acción de la N-glicanasa incluso, tras 42 horas de incubación, mantenían su reactividad con el monoclonal Tsp 130. Finalmente determinaron que este epítipo no es fosforilcolina.

Este conjunto de proteínas que compartían un epitopo carbohidratado común y que inducían una fuerte respuesta de anticuerpos de tipo IgG1 fueron posteriormente incluidas en el grupo antigénico TSL-1, en base a los datos de caracterización por medio de monoclonales, recogidos por varios autores (Appleton y col., 1991 ; Ortega-Pierres y col., 1996).

Jarvis & Pritchard (1992) realizaron un estudio en el que describían el papel de los epitopos carbohidratados en la generación de la inmunidad protectora frente a *T.spiralis*. Como antígenos emplearon también los somáticos, los de la cutícula extraídos con CTAB y los de ES. En un primer experimento determinaron cuales eran los efectos del tratamiento con concentraciones crecientes de peryodato sódico (agente oxidante que actúa sobre azúcares, rompiendo los anillos de hexosa) sobre los componentes proteicos de los preparados de *T.spiralis*, observando una degradación excesiva de la proteína cuando la concentración de peryodato era superior a 10 mM, en los tres tipos de preparados protéicos. La segunda parte del experimento consistía en comprobar como se modificada la afinidad de los diferentes tipos de lectinas tras el tratamiento con el peryodato, así en los controles detectaron que :

- Lectina de soja (SBA), no se unía a ninguna glicoproteína.
- Lectina de cacahuets (PNA) solo se unía a unas pocas proteínas en el rango de 67 kDa.
- Concanavalina A se unía fuertemente a un amplio rango de proteínas entre 90 y 18 kDa.
- Lectina de germen de trigo (WGA) mostraba un patrón más restringido, uniéndose predominantemente a las proteínas de la región de 45-47 kDa y a dos glicoproteínas de 18 y 90 kDa.

Con los tratamientos con peryodato se veía alterada la unión de las lectinas, y así a una concentración de 10 mM la unión de Conavalina A y WGA se veía enormemente reducida, indicando que la mayoría de los epitopos carbohidratados habían sido eliminados tras el tratamiento, sin que sin embargo se redujera el patrón de reconocimiento antigénico, al usar los sueros de animales infestados. Además señalan que el grupo de proteínas TSL-1 de la región de 43-55 kDa, continuaba siendo reconocido tras el tratamiento, sugiriéndose por tanto, que los anticuerpos reconocían la parte proteica. Sin embargo, a una concentración de 25mM la unión, tanto de las lectinas como de los anticuerpos desaparecía, implicando que a esta concentración las proteínas se habían degradado. Cuando estos autores inmunizaron ratones NIH con proteínas de ES nativas y tratadas con peryodato observaron que, en ambos casos, se detectaban por inmunoblot las proteínas de 45,47 y 50 kDa.

A pesar de que hasta ese momento se habían llevado a cabo una extensa caracterización bioquímica e inmunológica de los antígenos TSL-1, demostrándose que la mitad carbohidratada jugaba un papel fundamental en la inmunogenicidad, quedaba aún por esclarecer la composición de los carbohidratos de este grupo de antígenos. Wisnewski y col., (1993) usando cromatografía de gases asociada a espectrometría de masas (GC/MS), identificaron y cuantificaron los monosacáridos presentes, no solo en los antígenos TSL-1, sino también en el homogenado de la larva L1 y en los productos de ES. El hallazgo más importante fue la identificación de un azúcar inusual la 3,6-dideoxihexosa, presente en una proporción apreciable, tanto en las TSL-1 como en ES. La 3,6-dideoxihexosa se ha encontrado previamente solo en ciertos lipopolisacáridos de bacterias Gram-negativas y en los alcoholes ascarósidos de los huevos de *Ascaris*. Otro componente

fundamental era la fucosa, presente también en alta proporción en los tres grupos ya mencionados (homogenado de la L1, productos de ES y TSL-1). El total de la 3,6-dideoxihexosa y el 83% de la fucosa aparecían como residuos terminales no reductores, lo que parece apoyar la hipótesis de que uno o ambos azúcares están asociados con el epitopo inmunodominante de los antígenos TSL-1. Al analizar cada uno de los preparados antigénicos se observa que la composición glucosídica de la fracción TSL-1 (aislada por medio del monoclonal Tsp 130) se caracterizaba por dos aspectos : la fucosa constituía el 36 % mol del total de los residuos glucosídicos y la 3,6-dideoxihexosa constituía el 24 % mol. La 3,6-dideoxihexosa también se encuentra en gran proporción en la glicoproteína aislada de este grupo de 43 kDa. En el caso de los productos de ES el porcentaje de fucosa era del 19 % y del 21 % de 3,6-dideoxihexosa ; y además también se detectaban niveles elevados de hexosaminas (15% de GalNAc, 25% GlcNAc). El homogenado de las L1 tiene fucosa (12%) y hexosaminas (13% de GalNAc, 25% GlcNAc), mientras que 3,6-dideoxihexosa se ha encontrado en menor proporción que en los otros dos preparados antigénicos (8%).

Finalmente determinaron la configuración relativa de la 3,6-dideoxihexosa, mediante derivatización por alditol acetato y la absoluta, por acetilación de los octil-glucósidos quirales, dando como resultado que era una 3,6-dideoxi-D-arabinohexosa o tivelosa.

	TSL-1	ES	Homogenado
Tivelosa	24	21	8
Fucosa	36	19	12
Xilosa	0	1	1
Manosa	22	17	19
Galactosa	0.5	2	2
Glucosa	1	4	19
GalNAc	9	15	13
GlcNAc	7	21	25
Mio-Inositol	0.5	0	1
Ácido siálico	0	0	0

Composición glucosídica de diferentes preparados antigénicos de la larva de *T. spiralis*. Los valores numéricos representan la media de 4 valores obtenidos de dos análisis de CG/MS e indican los % mol del total de los residuos glucosídicos encontrados. (Wisnewski y col., 1993).

Una característica importante era la presencia en los tres preparados de gran cantidad de fucosa, la cual se sabe que tiene una alta relevancia inmunológica, tanto en mamíferos como en parásitos, por ejemplo *Toxocara canis* o *Schistosoma mansoni*. Además han sido detectados azúcares de la familia de la 3,6-dideoxihexosa en *Salmonellae* y *E.coli*. La tivelosa es el enantiómero encontrado en las cadenas laterales del antígeno O de lipopolisacárido LPS del serogrupo D de *Salmonella*. Todos los residuos de tivelosa y de fucosa se localizan en el extremo no reductor de las cadenas oligosacarídicas. El hecho de que estos dos azúcares predominantes se encuentren casi exclusivamente en las posiciones terminales no reductoras es consistente con la naturaleza inmunodominante de estos antígenos, ya que tanto monoclonales como anticuerpos policlonales dirigidos contra carbohidratos, lo hacen frente a los monosacáridos o los disacáridos terminales no reductores.

Ellis y col., (1994) investigaron el papel de los glucanos de los antígenos de *T.spiralis*, mediante el empleo de anticuerpos monoclonales. Observaron que aquellos monoclonales caracterizados como protectores (9D, 6D, 9E, 18D) eran incapaces de unirse a los antígenos de ES deglicosilados con TFMS (ácido trifluometanosulfónico) ; además los oligosacáridos aislados de las glicoproteínas por hidrólisis alcalina o enzimáticamente por la N-glicosidasa F, se unían a los monoclonales protectores pero no a los no protectores. Cuando trataron a los antígenos de ES con el TFMS, que elimina tanto los N- como los O-glucanos, pero deja intactos los polipéptidos, observaron que el patrón típico de los de ES se alteraba dando un doblete a 32 kDa, de forma que al emplear anticuerpos frente a una proteína recombinante gp45 eran capaces de reconocer una de las bandas de este doblete, y que por tanto, una de estos productos formaba parte de la proteína gp45. Por otro lado trataron de comprobar si eran sensibles a peryodato (que rompe entre carbonos adyacentes con grupos hidroxilos sobre azúcares accesibles). Para ello, combinaron el uso de monoclonales y Concanavalina A de forma que, solo eran sensibles al peryodato una banda de 67 y varias en el rango 50-62 kDa. Los autores concluyen que solo algunas de las glicoproteínas eran susceptibles al peryodato, pero que sin embargo el epitopo que se unía a los monoclonales protectivos era resistente al peryodato. Cuando sometieron los glucanos liberados a una hidrólisis alcalina (que solo elimina los O-glucanos) y los enfrentaron en ELISA al grupo de monoclonales protectores (9D, 6D, 9E y 18D) se vió que se unían a los carbohidratos, y que lo mismo ocurría con el monoclonal 18H que no es protector para ratas lactantes pero si para ratas adultas, mientras que el 16H, 18B y 305 no diferían de los controles de mucina porcina. Es decir el único anticuerpo monoclonal protector que no se unía a los glicanos de *T.spiralis* era el 305. Para saber si estos epitopos carbohidratados eran N-glucanos,

emplearon una enzima la N-glicosidasa F (PNGasa F), lo que permitió observar que solo los 9D, 6D y 18H eran capaces de unirse a los N-glucanos. Por inmunohistoquímica los glucanos reconocidos por 18H, 9D y 9E eran detectados en los esticocitos α y β . Estos anticuerpos también se unieron a los γ -esticocitos y a los núcleos hipertróficos de las células nodrizas. Y finalmente el epítopo que se unía al monoclonal 16H se restringía a los esticocitos α .

Aunque en los estudios anteriores se había revelado la presencia de tivelosa, Reason y col., (1994) ampliaron estos estudios usando espectrometría de masas de bombardeo rápido de electrones (FAB-MS) descubriendo una familia de N-glucanos tri y tetra-antenarios cuyas antenas están comprimidas en la estructura "capped" de la tivelosa : Tyv 1,3 GalNac β 1,4 (Fuc α 1,3) GlcNAc β 1.

Probert y col. (1996), con el fin de analizar la configuración anomérica de la tivelosa presente en *T. spiralis*, y debido a la dificultad de obtener muestras para su análisis, procedieron a la síntesis tanto de los monosacáridos : metil 3,6-dideoxy- α -D-arabino-hexopiranosido y la metil 3,6-dideoxy- β -D-arabino-hexopiranosido como de los 2-(trimetilsilil)etil disacaridos α - y β - Tyv-(1-3)- β -D-GalNac y preparación, a partir de los mismos, de dos glucoconjugados siendo posteriormente sometidos a pruebas de inhibición inmunoquímica o RMN de ^1H . Los estudios sugirieron que los epítopos β -tivelosa eran más activos que los α -glucosídeos y que además los antígenos de *Trichinella* era los primeros en detectarse, en la naturaleza en forma 3,6-dideoxihexosido con unión β .

Estos monosacáridos, disacáridos y los glucoconjugados anteriores se probaron frente a diversos monoclonales preparados en ratas : 9D,

6D,18B,16H (IgG1), 18H (IgG2a) ; 18D, 9E (IgG2c) y 305 (IgM). El 9D y el 18H son capaces de unirse a los N-glucanos solubles aislados de las glicoproteínas de *T.spiralis*. El 18H reconocía un trisacárido lineal poco frecuente β -D-Tyvp 1 \rightarrow 3)- β -D-GalNAcp (1 \rightarrow 4) β -D-GlcNAcp, mientras que el 9D se dirige hacia el tetrasacárido típico β -D-Tyvp(1 \rightarrow 3)- β -D-GalNAcp (1 \rightarrow 4) [α -L-Fucp(1 \rightarrow 3)]- β -D-GlcNAcp. El 9D parece tener la mayor afinidad por este epitopo, entre el grupo de monoclonales probados. Sin embargo mientras que el 18H no transfiere inmunidad pasiva a las ratas lactantes si lo consigue el 9D, lo que puede ser debido a los diferentes epitopos a los que se unen. Otro monoclonal protector, el 9E, era capaz de unirse a un disacárido β -D-Tyvp(1 \rightarrow 3)- β -D-GalNAcp (1) y al tetrasacárido β -D-Tyvp (1 \rightarrow 3)- β -D-GalNAcp(1 \rightarrow 4) [α -L-Fucp(1 \rightarrow 3)]- β -D-GlcNAcp (2). Los resultados obtenidos indicaban que este monoclonal tenía una menor afinidad que el 9D por la tivelosa. Además el 9E parece requerir un epitopo grande para ocupar totalmente su sitio de unión, lo que parece confirmarse porque este monoclonal depende de la presencia simultánea de GalNAc para unirse a (1) y se une más eficientemente al tetrasacárido (2) que al disacárido (1). Este monoclonal es el más protector del grupo de los anti-TSL-1

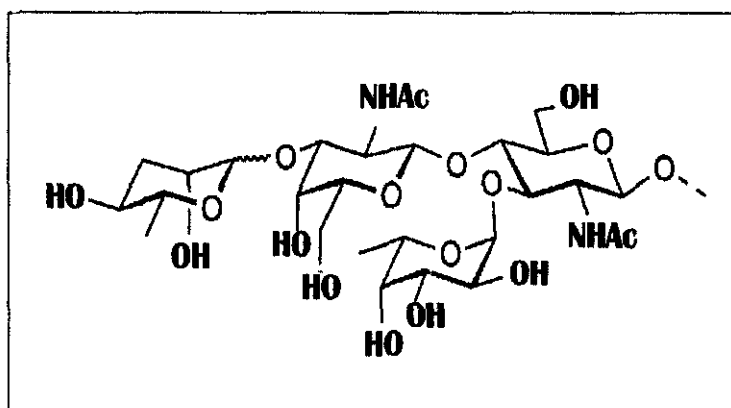


Figura 8. Estructura propuesta del epitopo tetrasacárido terminal de *T.spiralis* que está unido al trisacárido ramificado de manosa o al disacárido manosa de los N-glucanos tetra o tri-antennarios. (Reason y col., 1994)

Finalmente incluimos en este apartado el extenso estudio de una glicoproteína de 43 kDa purificada que ha sido realizado por diversos autores.

A partir de los productos de ES de las larvas L1, Gold y col., (1990) consiguieron separar mediante técnicas cromatográficas una proteína de 43 kDa que por deglicosilación, daba lugar a un polipéptido de 32 kDa, que no era reconocido por los anticuerpos generados frente a la proteína nativa.

Vassilatis y col., (1992, 1996a y 1996b) continuaron el estudio de esta proteína presente en el grupo de las TSL-1, para ello en primer lugar, clonaron el ADNc que codificaba esta proteína secretada por *Trichinella spiralis*. El análisis estructural de la secuencia deducida de 344 aa revelaba varios hechos interesantes: la presencia de dos puntos potenciales de N-glicosilación en los aa 24 y 117, y dos helices fuertemente anfipáticas, que podrían conformar un motivo de "helix-loop-helix", estructura que se ha encontrado en otras proteínas involucradas en el control génico muscular. Obtuvieron además anticuerpos frente a la proteína recombinante, ya que estos deberían ser más específicos que los inducidos por la proteína glicosilada de 43 kDa. Estos sueros reconocían la glicoproteína purificada, tanto en la forma glicosilada como deglicosilada. Sin embargo, los sueros reaccionaban además frente, al menos, otras dos proteínas de la fracción S3, de forma que al deglicosilar esta fracción estas bandas aparecían a un PM más bajo. El autor señalaba que esto podía ser debido bien a la existencia de diferentes variantes de la proteína de 43 kDa, que diferirían en la porción C-terminal, o bien a la presencia de distintas proteínas que compartirían en su estructura una parte inmunológica común. Finalmente detectaron en *T.pseudospiralis* una proteína que está relacionada con esta de 43 kDa.

Finalmente incluimos en este apartado el extenso estudio de una glicoproteína de 43 kDa purificada que ha sido realizado por diversos autores.

A partir de los productos de ES de las larvas L1, Gold y col., (1990) consiguieron separar mediante técnicas cromatográficas una proteína de 43 kDa que por deglicosilación, daba lugar a un polipéptido de 32 kDa, que no era reconocido por los anticuerpos generados frente a la proteína nativa.

Vassilatis y col., (1992, 1996a y 1996b) continuaron el estudio de esta proteína presente en el grupo de las TSL-1, para ello en primer lugar, clonaron el ADNc que codificaba esta proteína secretada por *Trichinella spiralis*. El análisis estructural de la secuencia deducida de 344 aa revelaba varias hechos interesantes : la presencia de dos puntos potenciales de N-glicosilación en los aa 24 y 117 , y dos helices fuertemente anfipáticas, que podrían conformar un motivo de "helix-loop-helix", estructura que se ha encontrado en otras proteínas involucradas en el control génico muscular. Obtuvieron además anticuerpos frente a la proteína recombinante, ya que estos deberían ser más específicos que los inducidos por la proteína glicosilada de 43 kDa. Estos sueros reconocían la glicoproteína purificada, tanto en la forma glicosilada como deglicosilada. Sin embargo, los sueros reaccionaban además frente, al menos, otras dos proteínas de la fracción S3, de forma que al deglicosilar esta fracción estas bandas aparecían a un PM más bajo. El autor señalaba que esto podía ser debido bien a la existencia de diferentes variantes de la proteína de 43 kDa, que diferirían en la porción C-terminal, o bien a la presencia de distintas proteínas que compartirían en su estructura una parte inmunológica común. Finalmente detectaron en *T.pseudospiralis* una proteína que está relacionada con esta de 43 kDa.

unificar criterios en la denominación de los antígenos distintos autores ha aplicado distintos criterios.

6.2.1. CRONOLOGIA DE LA RESPUESTA INMUNE

Se encuadran aquí los criterios propuestos por Denkers y col., (1990 y 1991) y Takahashi y col., (1990 y 1997). Ambos distinguen una respuesta humoral bifásica de forma que habría dos grupos de antígenos que los primeros autores designan como I y II y los últimos como respondedores rápidos y lentos, que pasamos a describir a continuación :

➤ GRUPO I / RESPONDEDORES RÁPIDOS

Se incluyen aquí a un conjunto de proteínas que inducen una respuesta humoral dos semanas después de la infestación. Takahashi además detalla en que estructuras subcelulares se encuentran estos antígenos : capas internas de la cutícula, hipodermis de la cutícula del intestino posterior, hemolinfa, gránulos citoplasmáticos de glucógeno, gránulos en las células glándulares del intestino, áreas discretas de las células primordiales genitales.

➤ GRUPO II / RESPONDEDORES LENTOS

En este grupo se incluyen aquellos antígenos que inducen una respuesta humoral 4-5 semanas tras la infestación. (No incluye sin embargo la fosforilcolina). Denkers identificaba seis grupos principales de proteínas en este grupo, con PM entre 43-68 kDa y pI 5.0-6.3, que comparten un epitopo inmunodominante que contiene fucosa y tivelosa. Takahashi señala que están presentes en los gránulos de los esticocitos, cutícula superficial, sustancia que ocupa el esófago (EOS) y sustancia que ocupa el intestino (MOS).

6.2.2. RECONOCIMIENTO POR DISTINTOS ANTICUERPOS MONOCLONALES Y POLICLONALES

En la Workshop Internacional sobre antígenos de *T.spiralis* celebrada en 1990 en Bithoven (Holanda), se tenía como objetivo fundamental el racionalizar la nomenclatura de los antígenos. Para ello se probaron en varios laboratorios una gran cantidad de anticuerpos monoclonales, sueros policlonales y preparaciones antigénicas, empleando diversos ensayos inmunoquímicos. (Appleton y col., 1991). A partir de los resultados distinguen nueve familias antigénicas denominadas TSL-1, TSL-2, TSL-3, TSL-4, TSL-5, TSL-6, TSL-7, TSL-8 y TSA. Recientemente se ha publicado una revisión de estos resultados (Ortega-Pierres y col., 1996).

A continuación resumimos brevemente las características de estas familias antigénicas :

GRUPOS ANTIGENICOS	Reconocimiento por AcM	PM (kDa) por SDS-PAGE		LOCALIZACIÓN
		Reductoras	No Reductoras	
TSL-1	Tsp130			Presentes en excrecciones y superficie del parásito (los AcM reconocen los Ag de superficie de 105, 97, 55 y 51 kD). Parecen específicas de estadio, eliminándose durante las mudas, a las 24 h. de entrada del parásito. Se originan en esticoma y son los mayoritarios.
	7C2C5			
	NIM-M1			
	9D4			
	9E6	45 y 50	45-100	
	18H			
	Mab1			
	E10			
TSL-2	305	45-50	Una única banda de 45 kDa	Secreciones y superficie de L 1 (solo 105 y 51 kD)
TSL-3	16H	No reacciona	45	Superficie de L1 (95 y 51 kDa). Dudosa en excrecciones
TSL-4	Mab 2			Superficie de la larva (105, 97, 55 y 51 kD). No aparecen en excrecciones. Están presentes también en extractos de adultos y embriones. Portan el epitopo fosforilcolina
	Ts2	45	35 y 45	
	US2 (sin PC*)			

TSL-5	6D8	30-36	Doblete de 36	Secreciones de L1 No están en la superficie de larva.
TSL-6	Mab 5		17	Para algunos autores este monoclonal reacciona con Ag del grupo TSL-1
TSL-7	6B1	32 y 45 A veces como solo la de 45	32 y 45	No aparecen en secreciones ni en superficie del parásito. No aparecen en secreciones ni en superficie. No son específicos de L1. Aparecen en extractos de adultos pero no en embriones. Portan el epitopo fosfatilcolina
TSL-8	Mab 6	40 y 45	43	
TSA-1	10E8	40		Excreciones de adultos. Específicos de este estadio

6.3. INMUNIDAD NATURAL O INNATA

La resistencia a la infestación por *Trichinella* puede ser no específica. Existe una fase innata de ésta que depende fundamentalmente de la especie, raza y carga genética del hospedador (Kazura, 1982, citado por Navarrete y col., 1991). Se han estudiado distintos factores que parecen influir y afectar la "normal" susceptibilidad de los animales de experimentación hacia este parásito (Kagan, 1960), así por ejemplo, se sabe que los perros más jóvenes son más susceptibles que los más viejos (Matoff, 1936, 1937). Riedel (1948 y 1950) encontró que esto también sucedía en el caso de los ratones, de forma que en los más jóvenes, había un mayor asentamiento de gusanos adultos que los ratones más viejos. Hendricksen (1948) también encontró que los ratones más jóvenes mantenían un mayor número de gusanos adultos que en los más viejos después de una infestación baja (50 larvas), pero no encontró diferencias cuando era una infestación elevada (300 larvas). El tiempo que se mantenían los adultos de *Trichinella* en el intestino del hospedador está también influenciado por la edad del hospedador y por el tamaño del inóculo (McCoy, 1932).

Sadun & Norman (1956) indicaron que en el caso del hamster había una relación inversa entre el tamaño de inóculo y el intervalo de supervivencia, así un inóculo de 3000 larvas provocaba la muerte de los animales en la fase muscular, mientras que con 4000 larvas la muerte se producía durante la fase intestinal, y estos mismos investigadores asociaron el tamaño de la infestación a la respuesta de anticuerpos en conejos (Sadun & Norman, 1957).

Existen otros factores que incrementan la "normal" resistencia de la infestación experimental en ratones, como son la retirada de agua entre 17 y 20 horas antes o después de la infestación (Campbell, 1953), leche en la dieta (Riedel, 1949), incremento anormal de peso en ratones y ratas como consecuencia de la preñez, (Hendricks, 1950), infestaciones concomitantes con otros helmintos como *Ancylostoma caninum* (Cox, 1952) o bien por la presencia de otros organismos no relacionados como *Salmonella* (Kazura, 1982 ; Alkarmi y col., 1989, citados por Navarrete y col., 1991).

Otros factores, como la glucemia, pueden afectar a la infestabilidad, Espona y col., (1989 ; citado por Navarrete y col., 1991) comprueba que la hiperglucemia provocada en ratas aumenta la infestabilidad del parásito, lo que además se acompaña de una mayor respuesta humoral.

Sin embargo dietas deficientes en vitamina A no alteran la inmunidad natural en ratones (Larsh & Gilchrist, 1950), y tampoco la administración de alcohol antes de la infestación parece afectarla (Larsh & Kent, 1949). En las cobayas si parece afectar de forma negativa, la infección conjunta con tuberculosis (Davis y col., 1945). Por otro lado, la irradiación con cobalto 60 incrementa la susceptibilidad de los ratones (Stoner & Hale, 1952).

Marti & Murrell (1989) determinan que la inmunidad calostrual en el cerdo juega un papel importante, pudiendo proporcionar hasta un 60% de protección, gracias a los anticuerpos vehiculados en el calostro, pero no a través del útero, siendo una inmunidad dirigida fundamentalmente contra los embriones. Corba y col., (1992) en ratones detectaron, que aunque la inmunidad se transfería por medio de la leche materna, la transferencia a través de la placenta sí parecía estar implicada en cierta medida en la

reducción de la fase intestinal, hasta un 40% en comparación con los controles.

La resistencia del hamster chino, es un ejemplo extremo de resistencia innata cuyo mecanismo se desconoce. Pese a tener una fase intestinal aparentemente normal y una respuesta humoral y celular similar a otros animales de experimentación, su actitud hacía la invasión y el establecimiento muscular es prácticamente nula. (Takada y col., 1989, citado por Navarrete y col., 1991).

6.4. INMUNIDAD ADQUIRIDA

La naturaleza y el carácter de la inmunidad adquirida en ratones, ratas y cobayas fue establecida en los trabajos de McCoy, Culbertson, Bachman, Roth y otros (Gould, 1945), se observa así que las ratas inmunes son capaces de resistir una infestación dos veces superior a la dosis letal. Larsh y col., (1952) demostraron que en ratones inmunes se produce una fuerte reducción en el número de gusanos adultos en el duodeno, dentro de los cinco días siguientes a la infestación (Kagan, 1960).

Dorin en 1946 inyectó suero inmune de conejo a un lote de ratas y suero de conejo normal a un lote de ratas control, encontrando que, tras infestar a los animales, los del primer lote aparecían normales mientras que los del control mostraban signos de enfermedad tras la infestación. Este mismo autor inmunizó conejos inyectando antígeno (400.000 larvas homogenizadas en 80 ml de solución salina), empleando como adyuvante hidroxido de aluminio, y analizó la resistencia a las infestaciones

experimentales. Campbell en 1955 y Chute en 1956 inyectaron antígenos metabólicos en ratón consiguiéndose una rápida expulsión de los adultos, junto con la inhibición del desarrollo de las hembras adultas y la reducción del número de gusanos adultos en el intestino, en comparación con el lote control. Skikhobalova en 1953 inyectó extracto salino preparado a partir de larvas de *Trichinella* varias veces en un periodo de 10 días, usando igualmente el antígeno protéico soluble en ácido de Melcher.

Sadun y col., en 1957 demostraron que si se administraba de forma reiterada larvas irradiadas a conejos, se conseguía un nivel de anticuerpos suficiente como para ser detectado por técnicas de floculación. El uso de la radiación para el estudio de los mecanismos de inmunidad fue utilizado por Kim (1957), así usando de forma racional los rayos X se podía eliminar una o más fases del ciclo del parásito. Si se irradiaban larvas con 1750 r se desarrollaban como gusanos adultos funcionales capaces de producir embriones. Pero si las larvas se irradiaban con 5250 r, no eran capaces de alcanzar la fase adulta, de forma que si se infestaban ratones con las larvas irradiadas con 3500 a 5250 r se conseguía una inmunidad adquirida, señalando que los antígenos producidos durante la fase de desarrollo de larva a adulto eran importantes para la inducción de esta inmunidad.

Ya en 1940, Taliaferro apuntó que los mecanismos de inmunidad implicaban una respuesta humoral asociada secundariamente a una cooperación celular. Oliver-Gonzalez en 1941 señaló que en el suero de conejos infestados con este parásito aparecían dos tipos de anticuerpos que parecían actuar significativamente sobre los adultos y sobre las larvas. El anticuerpo anti-adulto aparece 15 días después de la infestación y desaparece sobre el día 50 postinfestación. Este anticuerpo forma precipitados alrededor

de la boca, el ano y la vulva de los gusanos adultos en pruebas de microprecipitación. Además, este suero conteniendo anticuerpos anti-adultos protege parcialmente contra reinfestaciones, por mecanismos de transferencia pasiva. Los anticuerpos anti-larvas aparecen sobre el día 30 post-infestación alcanzando el máximo entre los días 45 y 60, disminuyendo ligeramente a partir de ese momento. Sin embargo, este antisuero no tenía actividad en transferencia pasiva y producía solo precipitaciones orales *in vitro*. Hendricks en 1952 confirmó estos hallazgos con experimentos en los que empleaba larvas irradiadas que evolucionaban a adultos estériles. Posteriormente, sin embargo, Ross (1952), Chute (1956) y Jackson (1959) no pudieron encontrar diferencias cualitativas entre los anticuerpos frente a adultos y larvas y sugirieron que los resultados obtenidos por Oliver-Gonzalez serían debidos a diferencias cuantitativas.

Larsh en 1953 fue capaz de demostrar la importancia de los factores humorales en la resistencia en el intestino delgado del ratón. Encontró que los ratones podían ser inmunizados si se colocaban larvas en el ciego, de forma que cuando estos animales se infestaban a continuación experimentalmente por vía oral con larvas, aparecía resistencia frente a las mismas. Esta resistencia del intestino delgado contra las larvas administradas por vía oral se iniciaba con los anticuerpos producidos contra las larvas que se habían dispuesto en el ciego. Larsh & Race, en 1954 observaron que se producía una respuesta inflamatoria tras la inmunización o la infestación experimental en el intestino, precedente a la eliminación de los adultos. Aunque estos autores suponían que previamente a la expulsión de los gusanos, estos eran atacados por los anticuerpos y que la reacción antígeno-anticuerpo, al igual que la propia presencia de los gusanos, iniciaban la respuesta inflamatoria.

Coker en 1956 (a y b) demostró que la respuesta celular en ratones infestados podría ser suprimida por la inyección de cortisona. La administración de este compuesto también suprimía la acción de la inmunidad adquirida durante al menos 14 días después de la infestación experimental. Este mismo autor demostró también que la administración diaria de cortisona inhibía completamente la respuesta celular del hospedador contra la invasión de las larvas en los músculos.

Larsh y col., en 1959 observaron que ratones que se habían inmunizado administrando cinco dosis de larvas irradiadas a 7000 r, presentaban una inmunidad igual que la conseguida por la infestación normal con larvas, pero presentaban unos títulos de anticuerpos séricos inferiores. El análisis de estas dos clases de infestaciones indicaban que la respuesta celular era similar en ambos casos, pero mas lenta en los ratones a los que se les había dado larvas irradiadas (Kagan, 1960).

Hasta aquí hemos descrito brevemente los primeros estudios que se desarrollaron paralelamente a los descubrimientos que se producían en el campo de la inmunología. A continuación revisaremos la inmunidad frente a *Trichinella* en función del tipo de respuesta.

6.4.1. RESPUESTA CELULAR

La acción del sistema inmune es posible gracias a la participación e interrelación de diferentes poblaciones celulares, conocidas como células inmunocompetentes. Estas células son fundamentalmente los linfocitos T, B, NK, macrófagos y polimorfonucleares. (Peña Martínez, 1994).

El intestino, en el caso de *Trichinella*, es el primer sitio de la parasitación y también el primer sitio de la respuesta inmune. La duración de la fase intestinal en una infestación primaria varía entre unas especies de hospedadores y otras. Por ejemplo, se ha estimado que los gusanos adultos persisten en el hombre durante 6 o más semanas, en los cobayas durante 30-40 días y en ratones y ratas (dependiendo de la cepa) entre 10-20 días. La fase intestinal termina con la pérdida gradual o repentina de los gusanos adultos, y mediante el tratamiento con inmunosupresores (Coker, 1955 ; Markell, 1958), se observaba claramente que este fenómeno, sin embargo, es sólo la culminación de una secuencia de respuestas del hospedador y otros efectos de la inmunidad, que son apreciables en el gusano una vez que la expulsión ha tenido lugar. Estos efectos incluyen una reducción en la fecundidad de las hembras adultas (Denham & Martínez, 1970 ; Despommier y col., 1977a), la aparición de cambios citopatológicos en células somáticas y reproductivas (Love y col., 1976, Kennedy & Bruce, 1981) y el desalojo de la población adulta del intestino (Larsh y col., 1952 ; Kennedy, 1980).

La mayoría de los análisis experimentales de inmunidad se han llevado a cabo en el ratón y en la rata. En ambas especies, la inmunidad protectora es dependiente de la actividad de los linfocitos derivados del timo (T) ; así, las infestaciones se ven prolongadas en los animales timodeficientes (Ruitenberg & Steerenberg, 1974 ; Perrudet-Badoux y col., 1980), en los privados de timo (Walls y col., 1973 ; Gore y col., 1974 ; Manson-Smith y col., 1979a) o en hospedadores con depleción de células T (Kozar y col., 1971 ; Dinetta y col., 1972 ; Machnincka, 1972).

En el ratón, la inmunidad frente a *T.spiralis* fue descrita por Culbertson (1942) y después ampliamente investigada por Larsh y col. en numerosos trabajos (Larsh, 1963,1970 ; Larsh & Race,1975). Estos trabajos definieron muchos de los parámetros de la infestación, mostrando que la inmunidad era transferida con las células linfoides y describiendo la íntima asociación entre la expulsión de los gusanos y los cambios inflamatorios en el intestino. Aunque inicialmente Larsh llegó a la conclusión de que la expulsión era resultado de la respuesta de hipersensibilidad retardada en el intestino, esta hipótesis fue posteriormente derivada al concepto de inflamación alérgica (Larsh & Race, 1975 ; Larsh & Weatherly, 1975). La inflamación hace inhabitable el intestino para los gusanos adultos y, en consecuencia, son expulsados del mismo. A los pocos días del inicio de la infestación (2-4 días) se produce una gran respuesta de linfoblastos (Rose y col., 1976, Grecis & Wakelin, 1982 ; Wakelin y col., 1982) y aparecen muchas células T en división en los nódulos linfáticos mesentéricos, que desaparecen cuando ha tenido lugar la expulsión de los adultos. Se puede demostrar directamente que esta población de células está específicamente relacionada con la inmunidad protectora por medio de estudios de transferencia pasiva de células de ganglio linfático mesentérico, desde ratones infestados a ratones no infestados (Wakelin & Lloyd, 1976 ; Wakelin & Wilson, 1977). Los ratones receptores adquieren una inmunidad, que se manifiesta por la reducción en el tamaño de los gusanos adultos, disminución de la fecundidad y expulsión acelerada de los gusanos del intestino.

Las células capaces de transferir inmunidad aparecen rápidamente en los ganglios linfáticos mesentéricos durante las infestaciones primarias, pero desaparecen una vez que la población de los gusanos es expulsada

(Wakelin & Wilson, 1977 ; Grecis & Wakellin, 1982). Esta capacidad para transferir inmunidad está asociada específicamente con los linfocitos en división (Wakelin y col., 1982). Así, las células de ratones donantes que han sido tratadas con vinblastina (un inhibidor de la mitosis) no transfieren inmunidad. Utilizando técnicas de separación celular, Wakelin y Wilson, (1979) demostraron que la capacidad de expulsar a los gusanos quedaba limitada a las células T, de forma que bastaba la transferencia de tan solo 3 millones de estas células para conseguirlo, mientras que las fracciones enriquecidas en células B, no parecían tener efecto sobre el número de gusanos en el intestino de los animales receptores, aunque si transferían cierta inmunidad que se veía reflejada en una menor fecundidad de los gusanos.

En ratas y ratones, el subtipo de células T que media la expulsión de los gusanos del intestino es T-helper (Grecis, Riedlinger y Wakelin, 1985), Esta población linfocitaria se caracteriza fenotípicamente por la presencia de la molécula CD4⁺ en su superficie celular. Dentro de los linfocitos T-helper se distinguen dos subpoblaciones : Th1 y Th2 en función de su distinta capacidad reguladora y productora de citoquinas. Los linfocitos maduros derivan probablemente de un precursor común, capaz de una diferenciación fenotípica alternativa a través de un estadio celular Th0 intermediario específico de antígeno (Reiner, 1994 ; Brown y col., 1993 ; Chensue y col., 1993). Las células Th0 secretan IFN- γ , IL-2 e IL-4 (Brown y col., 1993 ; Chensue y col., 1993). Una respuesta de tipo Th1 da lugar a células que secretan IFN- γ , factor de necrosis tumoral beta (TNF β) e IL-2 ; induce una reacción de hipersensibilidad retardada y además inhibe la producción de anticuerpos, aunque en estudios experimentales en ratón se ha descrito un aumento de la IgG2a (Cher & Mosmann, 1987 ; Else y col.,

1990 ; Else & Grencis, 1991 ; Finkelman & Urban, 1992). Las células Th2 activadas secretan IL-4, IL-5, IL-9 e IL-10. Estas secreciones dan lugar a mastocitosis intestinal, crecimiento y maduración de los eosinófilos sanguíneos y tisulares, y secreción de inmunoglobulinas por las células B, especialmente IgG1 e IgE (Mosmann & Coffman, 1989 ; Mosmann 1991 ; Finkelman y col., 1991 ; Thompson-Snipes y col., 1991). En algunos sistemas parásito-hospedador, el tipo y la magnitud de estas respuestas mutuamente inhibitorias son importantes determinantes de la protección producida por la respuesta inmune (Horowitz y col., 1986 ; Fiorentino y col., 1989). (Tagboto, 1995).

Se cree que las células CD4⁺ presentes en los nódulos linfáticos mesentéricos responden a los antígenos del parásito proliferando y migrando hacia el tejido intestinal, donde regulan los cambios inflamatorios observados durante la infestación (Wakelin & Denham, 1983 ; Grencis y col., 1991). Esta reacción inflamatoria, responsable directa de la expulsión de los adultos, que se manifiesta histológicamente por atrofia de las vellosidades, hiperplasia de la criptas y de las células caliciformes, es prevenida por la ciclosporina A, de forma que no se produce dicha expulsión (Bolas y col., 1988 ; Garside y col., 1992). Esta sustancia inhibe la producción de citoquinas por los linfocitos T (Thomson & Webster, 1988). Garside y col., (1992) han propuesto que la patología intestinal causada por *T. spiralis* aparece como un efecto secundario de la producción de citoquinas por las células T activadas por los parásitos y señalan la necesidad de identificar tales mediadores.

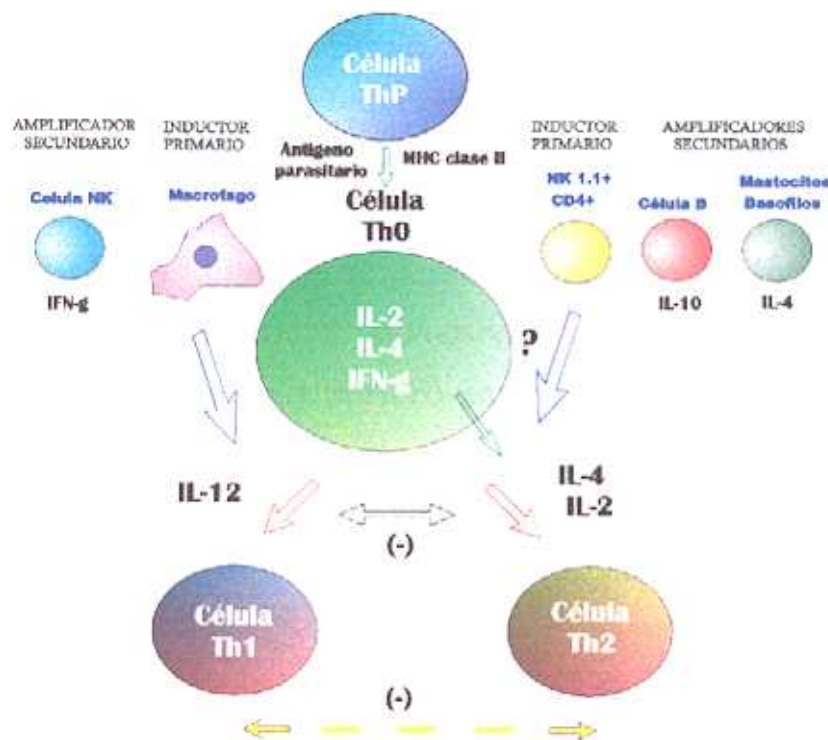


Figura 9. Relación entre las células $CD4^+$ precursoras de Thelper (ThP) y las células efectoras maduras $CD4^+$ (Th1 y Th2) que median diferentes aspectos de la inmunidad parasitaria. Tomado de Reiner, 1994.

Se han llevado a cabo diversos experimentos realizados con distintas razas consanguíneas de ratas y de ratones, en los que se ha observado una influencia genética en la respuesta frente a este parásito (Bell, 1992b). La respuesta fenotípica en las cepas de ratón se empezó a analizar a mediados de los '70, y ha permitido el uso, no solo de las cepas apropiadas para determinados experimentos, sino también analizar sus respuestas características en términos tanto funcionales como genéticos. Se llegó a la conclusión de que la capacidad de respuesta está controlado por dos tipos de genes : "background" y genes ligados al complejo mayor

de histocompatibilidad (H-2). Mediante experimentos de transferencia pasiva, reconstitución e irradiación se demostró que los genes "background" normalmente juegan un papel principal en la definición del fenotipo de la respuesta, a través de la regulación, en un primer momento, de la capacidad de expresar respuestas inflamatorias en el intestino ; mientras que los genes ligados al H-2, presumiblemente actuarían por influencia sobre las células T (Wakelin, 1993).

Crook & Wakelin (1994) diseñaron una serie de experimentos con el fin de determinar qué diferencias cuanti- o cualitativas a nivel de las células T y de las subpoblaciones de Th podían contribuir a las diferencias observadas en las respuestas de dos cepas de ratones, una definida como de alta respuesta (NIH) y otra de respuesta baja (B10). Existían marcadas diferencias entre ambas cepas, en cuanto a la linfoproliferación *in vitro* con el antígeno específico, cuando se emplean las células del ganglio linfático del lugar de la infestación. Las células de los NIH responden más temprano y mantienen un mayor nivel a lo largo de la infestación. Sin embargo, hay que tener en cuenta que los nódulos linfáticos de los NIH contienen un número total de linfocitos cinco veces superior que los de los B10 ; los autores explicaban que la expulsión más rápida en los NIH podía ser debida, más que a la presencia de un tipo específico de células, CD4⁺ o CD8⁺, a la existencia de un mayor número de células desde el principio. Ambas cepas mostraban una habilidad comparable para liberar IL-2 e IL-3 tras la infestación, pero nuevamente la respuesta era más rápida en los NIH, sin embargo en ninguna de las dos cepas había evidencia de la producción sustancial de IL-4. Esto parece contradecir las investigaciones que detectan la presencia preferente de IgG1 en el suero (Almond & Parkhouse, 1986b). Sin embargo, la medida de citoquinas que realizan es

sobre los ganglios linfáticos mesentéricos, y está establecido que la respuesta inmune, a nivel de la superficie de la mucosa, no tiene porqué coincidir con lo que ocurre a nivel periférico (Kelly y col., 1991). Se sabe que la IL-2 es producida por los Th1 y que es necesaria para la proliferación celular y la liberación de otras citoquinas. Según sus experimentos, ambas cepas de ratón tienen la misma capacidad absoluta de liberar IL-2, con lo que no parece posible explicar los marcadas diferencias fenotípicas de ambas especies, en términos de una diferente capacidad de dirigir la respuesta hacia una subpoblación determinada de células T. Sin embargo otros autores como Pond y col. (1989), usando ratones AKR y B10.BR, indicaban que la resistencia de los AKR estaba asociada con una respuesta de tipo Th1, mientras que los susceptibles B10.BR generaban una respuesta Th2. Por el contrario, Grencis y col., (1991), usando distintos pares de cepas de alta y baja respuesta, encontraban que, en todos los casos se producía una respuesta de tipo Th2, ya que cuando estimulaban las células de ganglio linfático mesentérico *in vitro* con antígeno, obtenían como resultado un aumento en los niveles de IL-3, IL-4, IL-5 e IL-9, sin que apreciaran secreción de IFN- γ . Estos resultados eran similares a los obtenidos con otros nematodos intestinales como *Nippostrongylus brasiliensis* y *Heligossomoides polygyrus*, donde se observaba un predominio del perfil Th2. Además, este predominio de la respuesta Th2 está correlacionado con los cambios que se producen en el intestino como mastocitosis, eosinofilia e incremento en los niveles séricos y tisulares de IgE, típico de la hipersensibilidad inmediata desencadenada en las helmintosis (Urban y col., 1989). Esta discrepancia entre autores podría explicarse por las observaciones de Kelly y col., (1991), quienes sugieren la compartimentalización de las subpoblaciones de Th durante la infestación. Finalmente, Crook & Wakelin

(1994) llegan a la conclusión de que la respuesta frente a *T.spiralis* no depende de los valores absolutos de las citoquinas producidas, sino del momento en que se producen y la rapidez con que actúan sobre las células efectoras, a nivel de los precursores en médula ósea de mastocitos y eosinófilos.

Anteriormente Zhu & Bell (1990) habían medido la producción de IL-2, IL-3 e IL-1 en macrófagos peritoneales, en ganglio linfático mesentérico y en bazo de ratones de diferentes razas consanguíneas infestadas con *T.spiralis*. Las razas seleccionadas habían sido caracterizadas como respondedoras rápidas, intermedias y lentas, en función de como se producía la eliminación de los adultos. Los ratones respondedores rápidos, NFS, producían aproximadamente el doble de IL-1 que la cepa respondedora intermedia C3Heb/Fe o los lentos B10.BR. En el caso de la IL-3, aunque variaba entre cepas, sin embargo, no parecía mostrar relación con la expulsión de los adultos. Para la IL-2 se analizaron además los híbridos obtenidos por el cruce de cepas, tanto con igual como diferente haplotipo, con el fin de analizar además el papel del CMH en el proceso de expulsión de los gusanos. Observan que, en el caso de las cepas originales, existía una gran variación en la producción de la IL-2 de ganglios linfáticos mesentéricos, en respuesta al antígeno de *T.spiralis in vitro*, así en los respondedores altos se detectaban altos niveles de IL-2 y bajos niveles, en los respondedores lentos, por el contrario en los intermedios, se observaban dos tipos de patrones, unos que producían más y otros menos cantidad de IL-2. Los autores seleccionaron estas citoquinas porque la IL-1 producida por los macrófagos activados juega un papel fundamental en la regulación de la respuesta inmune dependiente de células T. De forma similar, la IL-2 se sabe que es responsable de la regulación de la respuesta

inmune a través de la influencia sobre la división celular de las células T. Y finalmente, la IL-3 porque *in vitro* promovía la proliferación de los mastocitos de la mucosa. Además, se sabía que en el caso de *T.spiralis* la mastocitosis controlada por las células T del ganglio linfático mesentérico se acompañaba de la expulsión de los gusanos, (Alizadeh & Wakelin, 1982). Sin embargo, al realizar un análisis de regresión lineal con los resultados obtenidos en los híbridos, encontraban que la interleucina que parecía afectar negativamente a la expulsión de los gusanos en el intestino, era la IL-2, de forma que el aumento de IL-2, indicativo de una respuesta de tipo Th1, se relaciona con la presencia de una mayor cantidad de gusanos, (Cher & Mosman, 1987). De sus resultados concluían que sería la respuesta Th2 la involucrada en la expulsión de los adultos.

Numerosos estudios han confirmado la relación entre el fenómeno de expulsión en la fase adulta con una serie de cambios histopatológicos en la mucosa intestinal. Entre los cambios producidos están la infiltración de la mucosa por una serie de células como neutrófilos, eosinófilos, linfocitos, macrófagos y mastocitos ; alteraciones en la estructura de la mucosa y en la cinética celular, incrementándose los niveles de una serie de enzimas de origen leucocitario, y produciéndose cambios en el flujo de fluídos a través de la mucosa.

La inflamación celular aparece a los pocos días de la infestación, en las primeras manifestaciones están involucrados los neutrofilos, que son células asociadas con los cambios de la inflamación aguda. Sin embargo, la principal infiltración celular es la debida a los mastocitos, y en menor grado a los eosinófilos (Karmanska y col., 1973 ; Ruitenberg y col., 1977a ; Tronchion y col., 1979 ; Alizadeh & Wakelin, 1982a).

Respecto de los mastocitos, algunos autores (ver Wakelin & Denham, 1983) han observado que la degranulación de los mismos, ya sea directamente por moléculas del propio parásito, o a través de IgE o IgG1, induce la liberación de aminas vasoactivas como histamina y 5-hidroxi-triptamina (5-HT) que van a ejercer efectos sobre la permeabilidad vascular y la producción de mucus. Los mastocitos empiezan a parecer a partir del 4° día p.i.; aumentando su número considerablemente, con un pico máximo coincidente con el momento de la expulsión de los gusanos, para disminuir posteriormente. Se ha sugerido por tanto, que hay una correlación entre la respuesta de los mastocitos y la expulsión de los gusanos (Karmanska y col., 1973), pero solo a través de los datos cuantitativos obtenidos a partir de las pruebas histológicas del tejido intestinal. Sin embargo, el desarrollo de inmunoensayos para las proteasas específicas presentes en los mastocitos (Miller y col., 1988) ha hecho posible la medida, no sólo de la acumulación de mastocitos en los tejidos, sino también la cuantificación de la actividad de los mismos. Huntley y col., (1990) utilizando uno de estos métodos determinaron la presencia de una proteasa producida por los mastocitos de la mucosa en ratones (IMCP), que parecía tener importancia en la expulsión de los gusanos. Determinan que esta enzima está presente en altas concentraciones en el intestino delgado y grueso de ratones normales, pero está ausente de los tejidos no mucosos. Además, en los animales infestados por *Trichinella spiralis* detectan un aumento significativo de los niveles de la IMCP en los tejidos intestinales, lo que parecía concordar con la presencia de una gran población de mastocitos intraepiteliales, según habían indicado otros autores (Alizadeh & Wakelin, 1982b; Miller y col., 1988). Además, la presencia del enzima en el suero de los animales infestados, evidencia que los mastocitos de la mucosa son funcionalmente activos durante la

expulsión del parásito, ya que la liberación sistémica del IMCP coincidía con la expulsión inmune de los adultos del intestino del ratón. Estudios *in vivo* (King & Miller, 1984) habían sugerido que el papel de la enzima sería incrementar la permeabilidad de la mucosa, y por tanto promover la translocación de las moléculas derivadas del plasma a la luz intestinal (Murray, 1972 ; Askenase, 1979).

Tuohy y col., (1990), analizaron las posibles diferencias a nivel de mastocitos e IMCP, en función de la raza de ratón utilizada. Así, observaron que la respuesta de mastocitos en ratones NIH (respondedores rápidos) era más temprana y alcanzaba valores más elevados que en los ratones de respuesta intermedia (SWR) y baja B10. En los NIH, se producía una liberación temprana de IMPC y la gran cantidad presente en sueros en los días 9-12 coincidían con la expulsión. Sin embargo, el patrón de los mastocitos en los ratones SWR y B10 era bastante diferente de los NIH, de forma que era más lento, más sostenido y a un nivel mucho menor. Esto se reflejaba en las concentraciones en suero de la IMCP que se mantenían en meseta durante varios días, declinando al ir cayendo el número de gusanos. En caso de reinfestación, en las tres cepas se producía un incremento en las concentraciones de IMCP, aunque esto ocurría más tempranamente en los NIH y SWR que en los B10.

Más recientemente Grecis y col., (1993) analizaron el papel del llamado "stem cell factor" (SCF) o "c-kit ligand", en la generación de la hiperplasia intestinal de los mastocitos y en la inmunidad protectora. Este factor se caracteriza por su capacidad de promover el crecimiento y la proliferación *in vitro* de los mastocitos de la mucosa y del tejido conectivo (Anderson y col., 1990 ; Tsuji y col., 1991). Así, la inyección de la proteína

recombinante puede inducir mastocitosis *in vivo* (Tsai y col., 1991). Además actúa como factor quimiotáctico para los mastocitos (Meininger y col., 1992), y es capaz de activarlos para la liberación de mediadores solubles (Wershil y col., 1992), incrementando su sensibilidad por medio de la estimulación de sus receptores para IgE (Bischoff & Dahinden, 1992).

Este estudio había sido diseñado para investigar el papel del SCF durante la infestación intestinal, por bloqueo de la actividad de la SCF *in vivo* tras la administración de un anticuerpo monoclonal anti-c-kit, en animales infestados con *Trichinella*. En trabajos previos en los que se había llevado a cabo la administración intravenosa del anticuerpo monoclonal a ratones normales, se había observado que causaba una profunda alteración en varias de las poblaciones celulares hematopoyéticas encontradas en la médula ósea (Ogawa y col., 1991). En los animales infestados con *T.spiralis*, aparecía un alto número de mastocitos en el intestino a día 10 p.i. y esto se reflejaba en un aumento sérico e intestinal de los niveles de IMCP, lo que confirmaba los trabajos de Huntley y col., (1990) y Tuohy y col., (1990). La administración del anticuerpo monoclonal causaba una drástica reducción del número de mastocitos intestinales (97%) y de los niveles de IMCP encontrados en intestino y suero (98%), sin que, por otro lado se produjera la expulsión de los gusanos en el tiempo esperado.

Mientras que la estimulación de los eosinófilos es dependiente de IL-5 y la producción de IgE de la IL-4 (Sher y col, 1990), los mastocitos parecen ser dependientes tanto de la IL-3 como de la IL-4. (Madden y col., 1989 ; Madden y col., 1991). Para comprobar el papel de la IL-3 en la expulsión de los gusanos Korenaga y col. (1996) realizaron un estudio en

el que empleaban una IL-3 recombinante, de forma que cuando la administraban a ratones C3H/He infestados con *T.spiralis*, se reducía considerablemente la carga parasitaria respecto de los controles. Este fenómeno se apreciaba en los animales a los que se administró esta IL-3 entre los días 3-5 p.i., pero no en aquellos tratados de 16 a 20 p.i.. Esto sugería, por tanto, que la IL-3 regulaba la respuesta durante la fase intestinal como habían sugerido otros autores (Grencis y col., 1987), pero no durante la fase parenteral. Además, la respuesta de los mastocitos de la mucosa intestinal de los animales tratados con la IL-3 se inducía más rápidamente y era mayor que la del control. Sin embargo, la respuesta inducida por la IL-3 recombinante no se inhibía por el tratamiento con anti-IL-4 o anti-IL-5, por tanto estos resultados sugerían que en ratones, la IL-3 puede inducir la expulsión de los gusanos sin la cooperación de la IL-4 o la IL-5.

Otras moléculas han sido implicadas también en el control del crecimiento de los mastocitos *in vitro* incluyendo la IL-9 (Hültner y col., 1990) y la IL-10 (Thompson-Snipes y col., 1991). La IL-9 aumenta la supervivencia de los mastocitos de la mucosa (Hültner y col., 1990) y la IL-10 influye en el contenido de proteasas (Ghildyal y col., 1992), sugiriendo posibles papeles para estas citoquinas en la maduración y en el mantenimiento de los mastocitos de la mucosa.

El incremento de los eosinófilos, tanto en sangre periférica como en tejidos de mamíferos infestados por helmintos, sugiere que los eosinófilos pueden jugar un papel importante en la defensa del hospedador. Esta hipótesis se apoyaba en las observaciones de Butterworth y col., (1975) sobre la esquistosómula de *S.mansoni*, que podía ser destruida *in vitro* por

medio de una combinación de anticuerpos de pacientes infestados y eosinófilos. Hoy se sabe que las reacciones de citotoxicidad mediada por células y dependiente de anticuerpos (ADCC), son letales para otros helmintos, (Butterworth y col., 1984). Sin embargo, en el caso de *Trichinella*, este fenómeno de ADCC es específico para el estadio de embrión (Grove y col., 1977 ; Kazura & Grove, 1978 ; Mackenzie y col., 1978); las bases moleculares para esta especificidad fueron establecidas más tarde por Philipp y col., (1980, 1981) y Parkhouse y col., (1981), cuyos estudios demostraron que existían una serie de anticuerpos que reconocían específicamente los antígenos de superficie de este estadio.

Tanto los anticuerpos IgG como IgE promueven este tipo de reacción por unión de la fracción Fc a receptores específicos sobre la superficie de los eosinófilos. Tras esta activación, los eosinófilos producen una serie de secreciones helmintotóxicas como la proteína catiónica eosinofílica (ECP), la proteína básica principal (MBP) y la peroxidasa eosinofílica (EPO), las cuales adicionalmente, inducen la producción de radicales de oxígeno tóxicos (Silberstein & David, 1987 ; Spry y col., 1992), que son los responsables finales de la muerte *in vitro* del parásito (Bass & Szejda, 1979 ; Buys y col., 1981 ; Wassom & Gleich, 1979).

Kazura & Grove (1978) demostraron que las células del exudado peritoneal se adherían y mataban a los embriones en presencia del suero de animales infestados. Los anticuerpos que eran responsables de esta adherencia y muerte eran detectados a la cuarta semana de la infestación. Además, la incubación con embriones eliminaba la capacidad del suero para mediar esta reacción. Cuando la población de células del exudado peritoneal contenía solo un 2% de eosinófilos, no había una destrucción

significativa de las los embriones, pero cuando el nivel de los eosinófilos alcanzaba un 20%, casi todos los embriones eran destruidos. De forma similar, si la mezcla de células se preincubaba con suero anti-eosinófilos y complemento, la capacidad celular para destruir los gusanos se perdía, pero si la proporción de los eosinófilos se incrementaba, aumentaba también el número de embriones destruidos.

Mackenzie y col., (1978), demostraron que el complemento aumentaba la tasa de muerte de los embriones. En presencia del suero inmune de rata, las células destruían un 94% de embriones, mientras que cuando el mismo suero se calentaba, solo morían un 67% de los mismos. Sin embargo, determinaron que el complemento sólo, no mediaba la adherencia celular, y que la superficie de los embriones no activaba el complemento, sino que eran los anticuerpos los que mediaban la adherencia celular.

Posteriormente Ortega-Pierres y col., (1984a), prepararon una serie de monoclonales, uno de los cuales el NIM-M5, no sólo reconocía específicamente a los embriones de *T.spiralis* y era capaz de disminuir la infestabilidad de los mismos *in vivo*, sino que además era capaz de mediar la adherencia de los eosinófilos a los embriones reduciendo, en consecuencia, la infestabilidad de este estadio. Los niveles de protección (40%) eran similares a los obtenidos empleando sueros policlonales (Molonoy & Denham, 1979). El efecto de destrucción de los embriones se veía aumentado con la adición de suero fresco, y no se producía cuando el suero se calentaba a 56°C. De estos y otros trabajos (Mackenzie y col., 1980 ; Venturello y col., 1993) se deducía por tanto la importancia del complemento en la citotoxicidad mediada por anticuerpos. Y aunque en un

principio, como habíamos señalado anteriormente, se pensó que los embriones no eran capaces de activar el complemento, en la actualidad se sabe que esto no es así, y que son capaces de activarlo, incluso en ausencia de anticuerpos (Hong y col., 1992).

Más recientemente Venturiello y col., (1993, 1995), comprobaron que la eficacia de los eosinófilos dependía de la edad de los embriones, de forma que estas células eran capaces de atacar y destruir a los embriones de 20 horas, pero eran incapaces de matar a los de 2 horas, a pesar de que sí lo habían atacado al parásito. Otras células como monocitos y neutrófilos también son capaces de destruir a los embriones (MacKenzie y col., 1980 ; Kazura, 1981 ; Buys y col., 1984 ; Ortega-Pierres, 1984a ; Bell & Hua Wang, 1987) independientemente incluso de la edad de los propios embriones (Venturiello y col., 1993).

Por otro lado Bany y col., (1990), han utilizado la reacción de reducción de nitroazul de tetrazolio (NBT), para determinar la dinámica de la actividad de los neutrófilos circulantes durante el curso de una triquinosis experimental en ratones B6C3F y C3H, observando que el incremento de la actividad metabólica de los neutrófilos, se producía entre los días 20 y 30 p.i., es decir, coincidiendo con el período de migración y asentamiento muscular.

El papel de los macrófagos en la destrucción de los embriones era menos claro, debido fundamentalmente a que los estudios se realizaban sobre las células recogidas de los exudados peritoneales, y por tanto poco purificadas. Para evitar este problema, Fukumoto y col., (1991), usaron la línea celular de macrófagos Aa640-BB-2. La fagocitosis en esta línea

celular esta mediada por la porción Fc de las inmunoglobulinas y por el complemento (Tanigawa y col., 1983). Los autores encuentran que los cocultivos con embriones y con estos macrófagos tratados con LPS durante 72 horas llevaban a la muerte de los embriones. Otros parásitos son capaces de inducir, sobre los macrófagos, la liberación del factor de necrosis tumoral (TNF) (Taverne y col., 1990), y mostrar citotoxicidad, por ejemplo, sobre larva de *Schistosoma*, efectos que además pueden verse duplicados por la acción de otros productos liberados también por los macrófagos, como la IL-1. Los autores sugieren, a partir de sus resultados, que estas dos citoquinas podrían jugar también un papel importante en la destrucción de los embriones de *T.spiralis*.

Existen dudas sobre la implicación de los eosinófilos en la expulsión de los gusanos adultos del intestino. Hay que recordar nuevamente que la citoquina implicada en la maduración y proliferación de las células precursoras de eosinófilos, es la IL-5 (Peña Martínez, 1994), y como ya hemos mencionado, es esencial para mantener la respuesta eosinofílica asociada con las infestaciones helmínticas, (Sanderson y col., 1985 ; Clutterbuck y col., 1989 ; Rennick y col., 1990 ; Sasaki y col., 1993). Por otro lado, actúa como cofactor en la proliferación de los timocitos, diferenciación y crecimiento de las células B y síntesis de IgM e IgA. (Schimpl & Wecker, 1975 ; Swain & Dutton, 1982 ; Bond y col., 1987 ; Murray y col., 1987 ; Takatsu y col., 1988 ; Tominaga y col., 1988). Otros productos secretados por los linfocitos como GM-CSF e IL-3, también influyen en el desarrollo de los eosinófilos. Hay que destacar sin embargo, que el empleo de monoclonales frente a la IL-5 ha permitido poner de manifiesto el papel de la misma en el control de las helmintosis, así Herndon y col., (1992), empleando este tipo de monoclonales en ratones

infestados con *T.spiralis*, observan que no se altera el número de parásitos que se establecen en intestino o la resistencia a la reinfestación. Es decir, los eosinófilos no parecen esenciales en el control de las infestaciones, ya sean éstas primarias o secundarias.

En este sentido, Mink y col., 1994 han empleado anticuerpos frente a IL-4 e IL-5, para ver el efecto sobre la expulsión de los adultos, en ratones respondedores intermedios y lentos. Aparentemente, en los respondedores lentos la expulsión de los gusanos parecía estar menos influenciada por los mecanismos dependientes de IL-4, es decir mastocitosis y síntesis de IgE. Aunque en ambas cepas de ratón el tratamiento con anti-IL-5 influenciaba el número de eosinófilos intestinales, sorprendentemente en los respondedores lentos se aumentaba la expulsión de los gusanos, a pesar de que se había producido una disminución en el número de eosinófilos, es decir, estas células no parecían jugar un papel positivo en la expulsión. Sugieren que el papel protector de la respuesta inmune a nivel intestinal viene marcado por el diferente efecto de ambas citoquinas, de forma que los mecanismos dependientes de IL-4 tiene un claro efecto sobre la expulsión, mientras que los dependientes de IL-5 parecen retrasarla.

Lammas y col., (1992) habían realizado un estudio similar al anterior. Estos autores no encontraban correlación entre la eosinofilia intestinal y los niveles en sangre periférica y de médula ósea y tampoco existía correlación con el grado de resistencia a la infestación. Las diferencias entre las cepas de alta y baja respuesta se reflejaba en la distinta cinética de liberación de IL-5, pero no en su capacidad absoluta para producir la citoquina. La mayor diferencia entre ambas cepas, era que la primera liberaba altos niveles de la citoquina durante una infestación primaria, pero relativamente

poco en una secundaria ; por el contrario la cepa de baja respuesta, producía poca citoquina en una infestación primaria, y niveles equivalentes a los de respuesta rápida en una infestación secundaria. El hecho de que la respuesta de eosinófilos intestinales no se correlacionara con los patrones vistos en sangre y médula o bazo, indica la posibilidad de que los eosinófilos de la mucosa, más que de la diferenciación de precursores en la médula o bazo y posterior migración al intestino, procederían de la diferenciación de precursores locales, bajo la influencia de citoquinas liberadas por las células T de la lámina propia. Sus datos sobre la respuesta en médula y el tiempo de liberación de IL-5 y eosinofilia, sugieren que este patrón de respuesta refleja una liberación bifásica de la IL-5, que influye en la formación de eosinófilos y/o liberación de la médula ósea. Finalmente no había correlación entre la eosinofilia y el fenotipo de resistencia, implicando que la eosinofilia local no parece tener un papel importante en la resistencia a la infestación con *T.spiralis*, como habían propuesto otros autores (Adewusi & Grove, 1987).

Respecto a las larvas enquistadas, como consecuencia de la invasión aparecen células inflamatorias en el músculo : eosinófilos, neutrófilos, linfocitos y macrófagos (Weatherly, 1983). Karmanska y col., (1995) detectaron la presencia de células CD4⁺ y CD8⁺ en los infiltrados inflamatorios a partir de día 22 y 29 p.i. respectivamente, aunque a día 60 p.i. el número de las CD8⁺ disminuyó sensiblemente. Neifer y col. (1991) además de hacer un estudio inmunohistológico del infiltrado de las células inflamatorias alrededor de las larvas enquistadas, llevaron a cabo un estudio del papel del IFN- γ sobre la carga muscular y el grado de enquistamiento, empleando un IFN- γ recombinante. Los resultados demostraban la influencia del IFN- γ sobre la distribución de las

subpoblaciones de CD4⁺ y CD8⁺ durante la respuesta inmune pero, sin embargo, no observaban diferencias en el grado de enquistamiento. El IFN- γ es secretado durante la fase muscular, pero en mayor medida por los esplenocitos que por las células del ganglio linfático mesentérico, además la liberación de IFN- γ ocurre de forma simultánea a la secreción de IL-4 por los esplenocitos de ratones *in vitro* (Pond y col., 1989). No está claro, sin embargo, si esta citoquina tiene algún papel regulatorio relevante en la infiltración inflamatoria celular en el músculo. Hadas & Gustowska, (1995) observaron mediante estudios histoquímicos, la presencia de actividad peroxidasa en los infiltrados celulares que rodean a las larvas enquistadas ; la peroxidasa es un enzima que participa como sistema de defensa del hospedador frente a los radicales libres, cuyas fuentes pueden ser los neutrófilos, monocitos o eosinófilos. (Janin y col., 1992). Durante la fase final del desarrollo de la larva, ésta se rodea de una cápsula de colágeno que va a jugar un papel protector frente a la destrucción inmunológica. (Stewart, 1983).

Como resultado de los estudios llevados a cabo en *Leishmania spp*, en los que se había encontrado que una respuesta de tipo Th1 proporciona una inmunidad protectora, mientras que la respuesta de tipo Th2 conduciría a la exacerbación de la enfermedad, se sugirió la posibilidad de que de forma universal las respuestas Th1 proporcionarían protección frente a los patógenos. Urban y col., (1991,1992 ,1995) y Else & Grencis (1991) con sus estudios sobre *N.brasiliensis* y *H.polygyrus* y *T.muris* respectivamente, demostraron que esta hipótesis era solo una simplificación y que, al menos en algunos helmintos, la protección sería dependiente de las citoquinas liberadas por la subpoblación Th2. Además existe un fenómeno de regulación cruzada entre las respuestas Th1 y Th2, de forma que el INF- γ

inhibe el crecimiento de las células Th2 mientras que la IL-4 estimula el crecimiento de estas células. (Clifford & William, 1987 ; Gajewski & Fitch, 1988 ; Fernández-Botrán y col., 1988 ; Greembaum y col., 1988). Parece por tanto que la función inmune óptima requiere que la expresión génica del hospedador sea específica y que se seleccione aquella que permita destruir o eliminar al parásito ; evolutivamente esto debería suponer que el hospedador sería capaz de reconocer una serie de características que fueran comunes a un grupo de parásitos. Así por ejemplo, en el caso de los nematodos, que actúan como parásitos invasivos y que secretan una serie de enzimas proteolíticas como mecanismo para atravesar los tegumentos, migrar y alimentarse de las células y tejidos del hospedador, (McKerrow & Doenhoff, 1988 ; McKerrow, 1989), estos enzimas podrían actuar como los estímulos necesarios para el desarrollo de la respuesta más adecuada.

En el caso de *Trichinella* ya hemos comentado la controversia existente entre autores a la hora de establecer, no sólo el tipo de citoquinas sino el papel protector de las mismas, debido fundamentalmente a las diferencias encontradas entre unas cepas de ratones y otras. Urban y col., (1992) proponen que los parásitos son capaces de producir señales, tanto para inducir respuestas Th1 como Th2, y que las respuestas de las diferentes cepas de ratones a estas dos señales serían cuantitativamente distintas. Robinson y col., (1995c) trabajando con cepas de alta y baja respuesta, propusieron para *Trichinella* que ambas cepas presentaban, en cuanto a isotipos de anticuerpos producidos y subclases de células Th involucradas, un perfil de respuesta inmune similar durante la infestación, y que las diferencias entre ambos serían cuantitativas y temporales.

Más recientemente Frydas y col., (1996) han realizado un completo estudio de las citoquinas producidas durante la infestación por *Trichinella*. En su estudio analizan en suero los niveles de TNF- α , IL-6, IFN- γ , IL-4 y IL-10. Además, emplearon un compuesto, el 4-DPD (4-deoxypyridoxina), que es un inhibidor de la IL-1 y IL-2 en la inflamación crónica (Fridas y col., 1994 ; Trakatellis y col., 1992) por ser un potente antagonista de la vitamina B6, coenzima con propiedades anti-inflamatorias. Después de 15 días de la infestación, el TNF- α alcanzan un nivel máximo, mientras que la IL-6 era máxima después de 7 días, el IFN- γ a día 20 y la IL-4 a 14 días ; es decir, los más altos niveles para cada una de estas citoquinas se alcanzaba en periodos diferentes de la infestación. La IL-10 no se veía afectada por la infestación. Cuando los animales se les trataba con el compuesto 4-DPD, se observaba que la inhibición de la IL-6 y del TNF- α era dosis-dependiente en los primeros 7 días, mientras que la IL-4 se reducía solo con las dosis más altas ; además en estos animales no se veía afectaba la generación de IFN- γ ni de IL-10. La IL-6 parece estar involucrada en la temprana liberación de TNF- α e IL-1 por los macrófagos y frecuentemente las tres citoquinas actúan sinérgicamente. De hecho actúan activando las células T, las B y los macrófagos, y pueden aumentar las células T específicas y las respuestas mediadas por anticuerpos frente a los patógenos (Titus y col., 1991). La IL-6 induce la mayor parte de la activación génica de las proteínas de fase aguda y su síntesis proteica *in vitro* e *in vivo*. Sin embargo, algunos genes son inducidos directamente por el TNF- α y la IL-1, y otras son reguladas directamente por la IL-6 (Stadnyk y col., 1991). Se considera que la IL-10 es un factor de regulación de las respuestas Th1 y Th2 y es producido por las subpoblaciones de Th2 (Mossman & Moore, 1991). Sin embargo en este estudio los niveles de IL-10 en los animales infestados era bajo ; y por otro lado los niveles de IL-4

eran del orden de 12 veces superiores a los controles, por lo que los autores apoyan el concepto propuesto por Bogdan y col., (1990) de que la IL-4 causa una fuerte disminución del IFN- γ , ya que la adición del anticuerpo anti-IL-4 incrementa la síntesis de IFN- γ . Concluyen que, en la infestación, el nivel de IFN- γ es bajo porque el nivel de IL-4 es alto, y que la capacidad de la 4-DPD para inhibir el TNF- α y la IL-6, más que a otras citoquinas, puede ser debido a su acción sobre las células mononucleares y, en menor extensión, sobre las células T y B.

En el caso de las ratas no existe una división tan clara de las células CD4⁺ en subpoblaciones Th1 o Th2 como ocurre en los ratones (Mosmann & Coffman, 1989). Sin embargo, la presencia o ausencia del exón CD45RC, reconocido por el anticuerpo monoclonal OX22 permite diferenciar los linfocitos CD4⁺ de ratas en CD4⁺OX22⁺ y CD4⁺OX22⁻ (Powrie & Mason, 1990). Las primeras median las reacciones "graft-versus-host" y secretan IL-2 y/o IFN- γ en respuesta a los mitógenos *in vitro*, mientras que la CD4⁺OX22⁻ cooperan con las células B en las respuestas secundarias de anticuerpos y secretan IL-4 (McKnight y col., 1989). Por otro lado se sabía que, las células CD4⁺OX22⁻ aisladas del conducto linfático torácico de ratas infestadas con *T. spiralis*, transferían inmunidad pasiva a ratas no infestadas (Korenaga y col., 1989). Ramaswamy y col. (1994) analizaron el perfil de las citoquinas secretadas por esta subpoblación. Estas células CD4⁺ OX22⁻ son generadas en el intestino y aparecen en conducto linfático torácico a las 72 de la infestación. Aunque no encontraban diferencias en los niveles de ARNm de IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-10 y IFN- γ entre las subpoblaciones protectoras CD4⁺OX22⁻ y las supuestamente no protectoras CD4⁺OX22⁺ o CD8⁺, cuando analizaban la actividad de las citoquinas en los sobrenadantes de los cultivos de esta subpoblación

CD4⁺OX22⁻, tras 24 horas de estimulación con el antígeno de *T.spiralis*, observaban un aumento de la actividad de la IL-4 y la IL-5, y poca secreción de IFN- γ y TNF- α . Por el contrario, las células CD4⁺OX22⁺ secretaban niveles significativos de IL-4, IFN- γ y TNF- α ; mientras que las CD8⁺ secretaban IL-4, pero no IL-5. La producción de IL-4 era esencialmente igual tanto en células protectoras como en las no protectoras. Estos hallazgos sugieren que la presencia o ausencia de la secreción de IFN- γ , más que la IL-4 sola, determina si una subpoblación de células T tiene actividad protectora contra la infestación por *T.spiralis* en ratas. Estos mismos autores, Ramaswamy y col., (1996), más recientemente han desarrollado un exhaustivo trabajo, con el fin de determinar si los perfiles de las citoquinas de estas subpoblaciones se podían detectar en la linfa intestinal tras una transferencia pasiva. Los experimentos demuestran que las citoquinas medidas se derivaban de las células presentes en los tejidos, más que de las células procedentes de la linfa. La cantidad de cada citoquina variaba significativamente y aparentemente, de forma independiente, durante el curso de la infestación. Así en el caso del IFN- γ , la producción parecía ser cíclica, con picos pronunciados y depresiones. Los niveles más elevados se producían a 35-55 ; 74,5-92 y 178-193 horas tras la infestación. Los incrementos en el IFN- γ se correspondían con una disminución en la actividad de la IL-5. El primer pico para la IL-5 aparece a las 30 h p.i. ; que se seguía con una caída hasta valores basales entre las 35 y las 45 h.. Un segundo pico aparecía a las 60 h. y un tercer pico aparecía entre las 80 y 85 h. Nuevos incrementos aparecían entre 168 y 178 h y 274 y 289 h. Es decir, citoquinas de ambos tipos de respuesta Th1 (IFN- γ) y Th2 (IL-5) se producían de forma concurrente y en abundancia. La actividad de la IL-4 no era evidente en la linfa intestinal durante las primeras 55 horas p.i.. Sin embargo entre 60 y 90 horas mostraba un

actividad muy elevada. En las muestras recogidas al final del experimento aparece un pico a 168 h, disminuyendo hasta valores normales a 178h., para volver a aumentar entre 264 y 293 h. Respecto al TNF- α se observaban pequeños pero significativos aumentos entre 82-84,5 y 92 y 97, 168 y 183 y a 293 h. En un segundo experimento midieron los niveles de estas cuatro citoquinas en la linfa intestinal y en la linfa aferente durante un período de 48 a 73 horas tras la infestación, observando que no había diferencias significativas entre ambos tipos de muestras en cuanto a la IL-4, excepto en la linfa eferente a 60 h y después de 70 h p.i., donde era mucho más elevada. No observaban diferencias entre ambas fuentes de linfa en el caso de la IL-5 que estaba elevada, en ambos casos, entre 60 y 72,5 h. El IFN- γ estaba mucho más elevado a 48 y 57,5 h p.i. , mientras que en la linfa eferente no aparecía elevada en este mismo periodo. Para el TNF- α solo aparecían valores apreciables en el caso de la linfa intestinal, incrementándose especialmente entre 55 y 72,5 h. En general, observaban que la primera citoquina en aumentar era la IL-5, y los valores cíclicos eran fundamentalmente debidos al aumento del IFN- γ , la cual suprime la diferenciación de eosinófilos inducida por la IL-5 *in vitro*. La siguiente citoquina en aumentar en la linfa drenada al intestino era el IFN- γ , que aparecía hacia las 48 h. Por otro lado, los niveles elevados de IL-4 se alcanzaban durante la fase de expulsión del parásito entre días 10 y 11 p.i.. Excepto en el caso del TNF- α , los cambios en los niveles de cada citoquina en la linfa intestinal parecen estar directamente relacionados con las respuestas debidas a la infestación, más que con otros efectos como el proceso de canulación o los ciclos circadianos. En trabajos previos se había determinado que los nódulos linfáticos no eran esenciales para la inducción de respuestas protectoras o para funciones efectoras en las células protectoras contra *T.spiralis*, transferidas de forma pasiva (Korenaga y col.,

1989). Concluyen que el patrón de citoquinas generado en la linfa intestinal y en la eferente es totalmente diferente y que la mayoría de la IL-4 y la IL-5 presentes en la linfa eferente, durante las primeras 75 h. p.i. se deriva de los compartimentos intestinales, más que de los ganglios linfáticos mesentéricos.

6.4.2. RESPUESTA HUMORAL

A finales del siglo XIX, Von Behring observó que los sueros de animales que habían padecido difteria contenían sustancias que neutralizaban el efecto de la toxina diftérica. A estas sustancias, que se caracterizaban por ser termolábiles y no dializables, se les denominó anticuerpos, debido a su capacidad de anteponerse a las toxinas bacterianas. Después, cuando en 1937 Tiselius descubre la electroforesis y aplica este nuevo método al fraccionamiento de proteínas plasmáticas, identifica los anticuerpos como las proteínas del suero que se desplazan más lentamente. Esta fracción recibió el nombre de γ -globulina quedando, pues, temporalmente los conceptos de anticuerpo y de γ -globulina asociados como equivalentes. Posteriormente, cuando se aplicó la inmunolectroforesis al estudio de las proteínas séricas, se comprobó que no todos los anticuerpos emigran electroforéticamente con las γ -globulinas, sino que muchos de ellos lo hacen con las α y β globulinas e incluso con la albumina. Resulta, por tanto, que no todos los anticuerpos son γ -globulinas, por lo que Hebermans propone el término de inmunoglobulinas para designar a todas las sustancias con capacidad de anticuerpo. Hoy se conoce que son glicoproteínas, formadas por cadenas polipeptídicas, agrupadas en una o varias unidades estructurales básicas. La respuesta inmune humoral es mediatizada por los linfocitos B, los cuales reconocen al antígeno a través de las inmunoglobulinas de membrana. Sin

embargo, este estímulo no es suficiente para que se inicien los procesos de proliferación de estas células. Para ello es necesario que los linfocitos B, además del estímulo antigénico, reciban el estímulo de ciertas interleucinas. Pero el elemento efector final de la respuesta humoral son las inmunoglobulinas (Peña Martínez, 1994).

Un punto importante en la inmunidad humoral protectora es la clase de la cadena pesada de los anticuerpos producidos. Cada isotipo de inmunoglobulina puede mediar un único rango de funciones biológicas tales como la adherencia a células de defensa específicas o la activación del complemento, (Dessein y col., 1981, citado por Almond & Parkhouse 1986b).

Crandall & Crandall, (1972) en una ambiciosa serie de experimentos, estudiaron la producción de inmunoglobulinas en hembras consanguíneas de ratones C57/Bl y 1CR, dando una dosis de 200 larvas L1 por vía oral. Midieron los niveles séricos de IgG1, IgG2, IgA e IgM por medio de inmunodifusión radial a intervalos de tiempo después de la infestación. No se detectaron niveles de inmunoglobulinas durante la primera semana postinfestación. Durante la segunda semana, los niveles de IgG1 pasaron a ser de dos a cinco veces superiores, mientras que los niveles de IgM solo se duplicaron. Los niveles de IgA e IgG2 también aumentaron en este tiempo pero no tan dramáticamente, como las otras dos clases. En la tercera semana postinfestación, los niveles de IgM continuaron aumentando, mientras que los niveles de IgG1 disminuyeron. Finalmente en la cuarta semana los niveles de IgM eran aún más altos, mientras que por el contrario los niveles de IgG1, IgG2 e IgA habían caído hasta niveles basales.

Se midieron de forma simultánea en este mismo estudio los anticuerpos específicos circulantes anti-*Trichinella* por inmunofluorescencia indirecta, sobre las secciones de ratones infestados. A día 11 p.i., ya estaban presentes la IgG1 y la IgM, que reaccionaban con el esticosoma y el pseudoceloma de la larva L 1. Todas las clases de anticuerpos fueron detectados en la circulación de ambas cepas de ratón a día 15 p.i.. Los anticuerpos específicos de las clases IgG1 e IgG2 persistieron durante al menos 32 días, tras la infestación oral.

Por otro lado, realizaron estudios de inmunofluorescencia sobre varios órganos linfoides, en los cuales detectaron células portadoras de inmunoglobulinas en tres grupos de ratones: no infestados, hiperinfestados e hiperinfestados con reinfestación. En todos los órganos linfoides, el porcentaje de células portadoras de IgG1 estaban incrementadas en los dos grupos de los animales infestados, mientras que esto no sucedía para las células portadoras del resto clases de inmunoglobulinas. Los niveles séricos de IgM e IgA estaban también por encima de lo normal, demostrando que la técnica de inmunofluorescencia era lo suficientemente sensible para detectar cambios en las poblaciones celulares que contienen estas dos clases de inmunoglobulinas.

Golinska y col., (1976), determinaron como variaban los niveles séricos de inmunoglobulinas en ratones BALB/c en función de la dosis infestante, observando que las mayores diferencias se apreciaban en los niveles de IgG1, que parecían dosis-dependiente. Así, cuando los ratones recibían 100 larvas, los niveles caían por debajo de lo normal (2 mg/ml) en los días 7-14, volviendo a los valores normales a día 42, y llegando hasta 7 mg/ml a día 90 p.i.. Sin embargo, cuando a los ratones se les daba

dosis mayores (por ej. 500 larvas), los niveles a día 7 eran de 4,8 mg/ml, pasando a un máximo de 9 mg/ml a día 24, después de la infestación. Finalmente, el efecto del tamaño del inóculo sobre los niveles de IgM e IgA fueron indetectables.

Vernes y col., (1975) midieron los cambios en las cantidades totales de inmunoglobulinas circulantes en ratones CBA durante la infestación. Observaron inicialmente en los 5 primeros días p.i, un aumento de IgG1, IgG2a e IgA y en menor medida de IgM e IgG2b. Los niveles de todas las clases de inmunoglobulinas se mantuvieron elevadas durante los 60 días del periodo de estudio.

Rivera Ortiz & Nussenzweig (1976) midieron los niveles de IgG1 e IgE en cuatro cepas diferentes de ratones cosanguíneos (DBA/ 1, LAF, AKR y SJL) Administraban una dosis de 200 larvas via oral, volviendo a reinfestar tras dos semanas con otra dosis de 200 larvas. Las cepas DBA/1 y LAF mostraron una elevación (1 :160) de IgE específica anti-*T.spiralis*, entre la segunda y la tercera semana p.i., mientras que las cepas AKR y SJL presentaban niveles bajos o indetectables de este clase (1 :20). En contraste las cuatro cepas mostraron niveles importantes de IgG1 (de 1 :40 a 1 :160), iniciándose a la tercera o cuarta semana y persistiendo hasta la semana 14 p.i.

Ljungstrom & Ruitenberg (1976) midieron los niveles de inmunoglobulinas totales y clase-específicas frente a *T.spiralis* en dos grupos de ratones CBA machos, unos normales y otros timectomizados, irradiados y a los que se les había reconstituido la médula ósea (TXB). Los niveles de anticuerpos se midieron por inmunofluorescencia indirecta a

días 10, 17, 21 y 26, tras la infestación oral con 500 larvas L1, siendo la IgM la primera clase en ser positiva (día 10 p.i.). Sin embargo, los ratones TxB fueron negativos en este punto. A día 17, los niveles totales de inmunoglobulinas, IgM e IgA aumentaron en los ratones normales, mientras que los títulos en los ratones TxB solo aumentaron para la IgM. El título se mantuvo alto hasta día 21, en ambos lotes de ratones. Además, los niveles de inmunoglobulinas totales solo se mantuvieron altos en los ratones normales. Y mientras que los niveles de IgA fueron cayendo sobre día 26 en ratones normales, los de IgM no mostraron cambios en este punto, en ninguno de los dos lotes.

Jungery & Ogilvie (1980 y 1982) midieron anticuerpos frente a los antígenos de superficie de la larva L1 y los adultos de *T. spiralis*, en ratones resistentes (NIH) y susceptibles (C3H), durante un período de 90 días utilizando dos tipos de ensayos. El primero consistía en pruebas de inmunoprecipitación, empleando la fracción soluble de los componentes de superficie marcados con 125 I de cada estadio, frente al suero recogido durante este período. El segundo ensayo se basaba en la adherencia de eosinófilos mediada por anticuerpos. Ambas cepas de ratones presentaban un rápido y brusco aumento de los respuesta de anticuerpos contra los antígenos de superficie de la larva L1. También en ambas cepas, los niveles de adherencia de eosinófilos aumentaron hasta valores similares frente a dicho estadio, con un pico a día 30 p.i.. En contraste, la inmunoprecipitación y la reacción de adherencia contra la fase adulta se alcanzaron pronto y rápidamente, sólo (el pico fue a día 20 p.i.) en los ratones NIH. Las dos cepas de ratones también se diferenciaron en cuanto a la respuesta de los niveles de adherencia frente a los antígenos de superficie de los embriones. En los ratones C3H el pico se alcanzaba 5 días

después que en los NIH, en los que se producía a día 40 p.i.. La inmunoprecipitación revelaba que los anticuerpos implicados en ADCC se producían rápidamente, con un pico de respuesta a día 30 para los NIH y de 35 para los C3H. (Despommier, 1987).

Almond & Parkhouse (1986b) realizaron un estudio de la respuesta humoral en dos cepas de ratones, una resistente (NIH) y otra susceptible (C3H), que se sabía que presentaban un intervalo diferente de expulsión de los adultos durante una infestación primaria. Midieron los niveles de IgA, IgM, IgG1, IgG2 e IgG3 por inmunodifusión radial y además, por medio de un ensayo de inmunoprecipitación, determinaron qué isotipos se desarrollaban frente a los antígenos de superficie y de ES de cada uno de los tres estadios de desarrollo del parásito. A lo largo del estudio hubo un aumento gradual de las IgM, IgG1 e IgG2, mientras que los niveles de IgG3 fueron bajos durante el mismo. Los incrementos en la IgM e IgG2 fueron mayores en los ratones C3H. En contraste, el incremento en IgG1 en los NIH ocurría más rápidamente y se mantenía a niveles más altos. Sin embargo lo más destacable fue la diferente respuesta en los niveles de IgA, en los C3H que, a lo largo de los 40 días p.i. de la prueba fue baja y errática, mientras que en los NIH fué no solo rápida sino que quintuplicó su valor a día 13 p.i., para decaer rápidamente y alcanzar valores semejantes a los C3H hacia el día 25 p.i.. La respuesta por IgA frente a los antígenos de superficie, presentó un pico elevado y rápido en los tres estadios en el caso de los ratones NIH. Además, parecía existir una correlación positiva entre la rápida expulsión del parásito, en la cepa de ratones resistente, y la síntesis de anticuerpos IgA frente a la superficie del adulto, detectable precisamente en ese punto de la infestación, no encontrándose sin embargo IgA frente a las secreciones del adulto ni de la larva. Por el

contrario, en dicho momento de la infestación no había producción de IgA ni expulsión de adultos en los C3H. Otros autores como de Vos y col., (1992) han encontrado que la IgA secretora es el principal isotipo presente durante la fase intestinal, existiendo una correlación entre los niveles de IgA en la mucosa y la reducción en el tamaño de los adultos y su fecundidad. Con el empleo de vacunas orales que combinan el extracto larvario con la toxina colérica que induce un aumento en los niveles de IgA, de Vos & Dick, (1993) no conseguían acelerar la expulsión, aunque sí reducir el tamaño, fecundidad y asentamiento muscular y Robinson y col., (1995a) sólo conseguían aceleración en la expulsión intestinal, en el caso de los respondedores rápidos, NIH, aceleración que, sin embargo, también conseguían con el empleo de vacunas parenterales con FCA que induce preferentemente IgG.

Dessein y col., (1981, citado por Santamarina y col., 1988b) afirman que los anticuerpos IgE específicos inducidos frente a *T.spiralis* parecen estar involucrados en la protección del hospedador contra este parásito. Según Spaldonova y col., (1981) la IgE participaría mediando las reacciones de anafilaxia cuando la larvas mueren por acción de los antihelmínticos. Santamarina y col., (1988b) pretendían ver cual era la contribución de los distintos estadios en la inducción de la IgE, llegando a la conclusión de que en ratones BCF1, la respuesta de este anticuerpo no se ve aumentada al aumentar la dosis infestante. Además parece necesaria la presencia, durante un determinado período de tiempo, de los adultos en el intestino para inducir una respuesta de anticuerpos IgE específica y detectable (entre 9–14 días). Por otro lado también las larvas migratorias contribuyen a la producción de IgE específicos, de forma que además del requisito anterior, es necesaria la presencia de un mínimo de larvas migratorias L1,

concluyendo por tanto, que la inducción de IgE no es estado-específica. Para verificar la asociación de la IgE específica con los fenómenos de protección del hospedador frente a la infestación, estos mismos autores Santamarina y col., (1987 y 1988a) realizaron un estudio empleando diversos fármacos de actividad inmunosupresora, con el fin de modificar la respuesta reagínica originada en la infestación por *T.spiralis*. Como consecuencia de la actividad inmunosupresora de los mismos, administrados durante la infestación, se incrementa el número de larvas enquistadas obtenidas, sin embargo su administración no ocasiona modificaciones en la producción de anticuerpos IgE específicos frente al parásito, lo que parece indicar que la presencia de estos anticuerpos no es fundamental para los fenómenos de defensa frente a *Trichinella*.

Otros autores han continuado en esta línea, así Korenaga y col., (1996b) intentan ver si la IL-3 recombinante acelera la producción de IgE dependiente de IL-4. En un trabajo previo, estos mismos autores no parecen encontrar relación entre la expulsión de adultos en la fase intestinal y la presencia de IgE (en un estudio en el que emplean ratones deficientes en IgE), mientras que se sugiere que los mastocitos inducidos por el tratamiento con IL-3, son los efectores de la expulsión del intestino de los gusanos adultos. En este estudio el nivel sérico de IgG 1 en los ratones tratados con la IL-3 recombinante era mayor que en los no tratados, lo que contrasta con los niveles de IgG2a. Esto sugiere que la infestación por *T.spiralis* puede inducir mecanismos de cambio de clase y que las respuestas de IgG1 no son tan dependientes de IL-4 como las respuestas de IgE. Sin embargo, de este estudio no se puede concluir que la IL-3 actúe directamente sobre las células B para cambiar el isotipo, que

la IL-3 estimule las células T para producir IL-4 y/o que la IL-3 modifique la función de las células accesorias, aunque sí se demuestra que la IL-3 esta involucrada en la producción de IgE.

A lo largo de los últimos 25 años diversos trabajos, especialmente los del grupo de Larsh, han puesto de manifiesto la íntima asociación entre la expulsión de la fase adulta con cambios histopatológicos en la mucosa intestinal y fenómenos inflamatorios mediados por las células T (Wakelin, 1993). Sin embargo, con el fin de comprobar que los anticuerpos son un punto fundamental de la respuesta inmune en la expulsión de los gusanos Robinson y col., (1995a) prepararon un estudio de transferencia pasiva, en el que comparaban los efectos protectores de la vacunación, la infestación y la combinación de ambas, sobre dos cepas de ratones, una respondedora rápida (NIH) y otra lenta (B10). Asombrosamente no conseguían protección en ninguna de las dos cepas de ratones cuando se les transfería suero de animales infestados, ya fueran NIH o B10; mientras que sí se conseguía transferir una inmunidad similar, tanto a los receptores homólogos y heterólogos, tras la inmunización con extracto de la L1, incluso a pesar de que el suero de los NIH contenía mayores niveles de anticuerpos que el de los B10. Los mejores niveles de protección se conseguían en los sueros en los que se combinaba inmunización e infestación en ambas cepas, *detectándose niveles significativos de anticuerpos IgG1 específicos frente al parásito*. Sugieren por tanto, que la protección se debe a los anticuerpos más que a las citoquinas, ya que estas aparecen elevadas, tanto en el ganglio linfático mesentérico como en bazo (Robinson y col., 1995b), en los primeros días de la infestación y sin embargo no tienen éxito en los procesos de transferencia. Esto ha sido corroborado por otros autores

(Neifer y col., 1991), quienes observan que la administración de citoquinas tiene poco efecto durante la infestación.

Estos mismos autores (Robinson y col., 1995c), en un estudio paralelo, determinaron que ambas cepas de ratones, respondedores lentos y rápidos, presentaban una respuesta fenotípica comparable, tanto en el caso de la infestación como de la vacunación, sin que hubiera diferencias cualitativas en los perfiles de respuesta, con predominio de IgG1 e IgG2b, y que las diferencias en ambas cepas eran debidas al tiempo y a la magnitud de la respuesta. Otros autores disienten a este respecto, así Ponds y col., (1989) analizando la respuesta humoral y la secreción de citoquinas por linfocitos estimulados con antígenos de *T.spiralis*, en ratones resistentes y susceptibles a la infestación, encontraron que los primeros producían más γ -interferon e IgG2a específicos que los segundos, mientras que los susceptibles producían más IL-4, IgE e IgG1 que los resistentes.

Denkers y col., (1990a y 1990b) establecieron que la infestación con *T.spiralis* inducía una fuerte respuesta humoral bifásica en ratones, inducida por dos grupos de antígenos diferentes descritos ya previamente ; el grupo I presenta un máximo de respuesta de anticuerpos a día 13 p.i. , mientras que los anticuerpos frente al grupo II aparecen entre día 27-35 p.i., incrementándose posteriormente, con predominio en ambos casos de la IgM y la IgG1. Además, la mayor parte de estas IgG1 estaban dirigidas contra un epitopo que contiene un resto glucosídico, presente en el grupo II y específico de la L1. Sin embargo, a pesar de que las proteínas del grupo II inducen una fuerte protección cuando se emplean en inmunización, los autores sugieren que el papel de este grupo de proteínas no esta

relacionado con la infestación primaria, ya que los anticuerpos específicos aparecen cuando los gusanos ya han alcanzado el músculo.

En el caso de los embriones, se sabe que estos inducen una fuerte respuesta protectora en ratones, sin embargo ésta se produce demasiado tarde para ejercer un efecto durante la infestación primaria y, en una infestación secundaria, la expulsión intestinal ocurre antes de que se produzcan los embriones, sin embargo esto parece ocurrir en aquellos hospedadores que se definen como respondedores rápidos, mientras que en aquellos en los que hay una mayor persistencia de la fase adulta, en una infestación secundaria sería temporalmente posible la producción de anticuerpos efectores frente a los embriones. (Bell & Hua Wang, 1987).

Kazura & Grove (1978) y McKenzie y col., (1978) describieron por primera vez la destrucción *in vitro* de los embriones mediada por células y dependiente de anticuerpos, señalando que este fenómeno era específico de este estadio. Las bases moleculares para esta especificidad de estado fueron más tarde establecidas por Philipp y col., (1980, 1981) y Parkhouse y col., (1981), donde se demostraba que anticuerpos que reconocían un estadio no reconocían los otros. Philipp y col., (1981) y Jungery & Ogilvie (1982), trabajando con ratas y ratones respectivamente, encontraron que esta citotoxicidad celular mediada por anticuerpos se generaba 15, 25 ó 30 días después de la infestación por *T.spiralis* en ratas Wistar, ratones NIH y C3H respectivamente (Bell & Hua Wang, 1987).

Recientemente Darwish y col., (1996), compararon el grado de inmunización que se consigue con distintas dosis de antígenos de los diferentes estadios, han llegado a la conclusión de que, en el caso de los adultos, se consigue una elevada protección frente a una infestación

experimental pero no se altera la fecundidad, datos que están en consonancia con los obtenidos por Gamble (1985b). La inmunización con los antígenos de los embriones parecen ser menos protectora frente a la fase intestinal pero puede inhibir la diseminación y el establecimiento muscular, en concordancia con los datos Murrell (1985a), quien encuentra que la respuesta inmune contra los embriones es estado-específica. Finalmente, es con las larvas musculares con las que consiguen los mejores resultados de protección frente a los tres estadios (adultos, embriones y larvas musculares), lo que coincide con Despommier (1985), Despommier & Lacetti (1981a y b) y Gamble (1985b). Sin embargo, concluyen que los mejores resultados son los obtenidos por la combinación de antígenos de adulto y de larvas musculares, aunque, no sea totalmente protectora.

Sin embargo, otros autores como Marti y col., (1987) si han conseguido, aunque en suídos, una protección superior a la conseguida con los antígenos de ES, cuando utilizaban para inmunizar, bien embriones completos, a los que previamente habían sometido a un tratamiento de congelación-calentamiento o la fracción insoluble, obtenida tras la sonicación de los embriones. El hecho de que los antígenos insolubles sean los protectores podría ser debido a que estos estén asociados a la epicutícula y por tanto serían necesarias técnicas de extracción más drásticas para su solubilización.

En lo referente a la respuesta frente a las infestaciones secundarias, se han encontrado diferencias entre ratones y ratas, que radican sobre todo, en la inmunidad protectora desarrollada frente a la reinfestación. En los ratones, esta inmunidad sólo se manifiesta durante la fase intestinal de la primera infestación y no suele persistir más allá de los primeros 16 días

tras la infestación primaria. Está dirigida contra los adultos y provoca una expulsión de los mismos de forma mucho más rápida que cuando se trata de la primera infestación (Wakelin & Denham, 1983). En las ratas además de esta inmunidad protectora se produce el fenómeno conocido como de "expulsión rápida", consistente en la eliminación de hasta un 99% de la dosis de larvas infestantes, en las 24 horas post-reinfestación (Wakelin & Denham, 1983 ; Appleton & McGregor, 1984). Bell (1992a) ha propuesto diferenciar la expulsión rápida que ocurre en ratas, de la expulsión que se produce en los ratones a la que ha designado como "expulsión asociada", que parece ser una respuesta específica anti-larvaria dependiente de células T y que no dependería del complejo mayor de histocompatibilidad como proponían Wasson y col., (1984), (Bell, 1992b). Aunque el mecanismo preciso del fenómeno en las ratas no se conoce con exactitud, parece ser que se trata de un conjunto de respuestas mediadas por anticuerpos. En el caso de las ratas adultas los anticuerpos séricos parecen ser funcionalmente dependientes de cambios producidos en el intestino por la exposición a una infestación parcial (preadulto o/y adultos), o al ciclo completo del parásito. Este ambiente favorable se puede conseguir mediante transferencia pasiva de células CD4⁺ OX22⁻, aisladas del conducto linfático torácico (Korenaga y col., 1989), de forma que este tipo de transferencia induce una respuesta de anticuerpos específica del parásito y eosinofilia intestinal (Wang y col., 1990). En el caso de las ratas lactantes, el proceso de expulsión rápida parece depender únicamente de los anticuerpos específicos frente a las L1, que son transferidos a las crías a través de la leche ; la IgG1 y la IgG2c, parecen ser las subclases más protectoras (Appleton & McGregor, 1984 y 1987). Sin embargo, otros autores (Perry, 1976 ; Corba y col., 1992) proponen que este fenómeno de expulsión en la ratas lactantes es debido al desarrollo de una

hipersensibilidad de tipo Arthus, que induce una inflamación intestinal, creando un ambiente desfavorable para el asentamiento de los adultos. Por otro lado, Otubu y col., (1993) ponen en duda el papel exclusivo de los anticuerpos, ya que no conseguían reproducir el fenómeno de expulsión en el caso de las ratas destetadas (aunque se alteraba el comportamiento migratorio de las larvas en el intestino), cuando empleaban una serie de anticuerpos monoclonales, que sí se comportaban como protectores en el caso de las ratas lactantes. Proponían por ello, la existencia de un cofactor que capacitaría a dichos anticuerpos para la expulsión de los gusanos.

Ahmad y col., (1991) intentaron relacionar el fenómeno de rápida expulsión con la presencia de IgE, ya que se sabe que esta inmunoglobulina está particularmente asociada con las infestaciones por helmintos, sin embargo aunque en su estudio parece existir una clara relación, no se puede descartar que también estén implicados otros isotipos de inmunoglobulinas, siendo además probable la existencia de algún otro factor en el suero que medie esta rápida expulsión, ya que no encontraban correlación entre la fuerza con que se producía la rápida expulsión y los títulos de PCA (anafilaxia cutánea pasiva) en los sueros recogidos a distintos tiempos cuando se empleaban para transferir inmunidad y además, cuando por cromatografía de afinidad se eliminaba la IgE igualmente se mantenía el fenómeno de rápida expulsión, aunque no se detectaban niveles de PCA.

Carlisle y col., (1990 y 1991) analizaron como factor relacionado con la rápida expulsión, el atrapamiento de las larvas recubiertas con los anticuerpos protectores en el mucus intestinal que actuaría como una barrera protectora antígeno-específica, ya que parece ser que los

anticuerpos que recubren las larvas reconocen epitopos glucídicos sobre dos antígenos de superficie (Appleton & Usack, 1993). Sin embargo, para Carlisle este atrapamiento no sería el mecanismo directo de la rápida expulsión, sino que más bien induciría el desplazamiento de la larva de su nicho epitelial. Finalmente, no se sabe si es la unión del anticuerpo a la superficie del parásito o si es la unión específica de los anticuerpos protectores frente a los antígenos de ES portadores del epitopo glucídico, la responsable del desplazamiento. (Ortega-Pierres y col., 1996).

Revisamos a continuación varios estudios en los que se midieron los niveles de anticuerpos en ratas por diversos métodos.

Ottesen y col., (1975) administraron por vía oral, 1200 larvas L1 a ratas adultas machos de la cepa Lewis, sangrándolas posteriormente a diferentes tiempos, durante más de 400 días. Midieron los niveles de anticuerpos por hemaglutinación pasiva y anafilaxia cutánea pasiva. Los títulos de IgE por la prueba de PCA aumentaron a día 10 (1 :8), con un pico a día 30 p.i. (1 :256), retornando hasta niveles basales (1 :4) a día 150. Por el contrario, los niveles en IHA aumentaron ya a día 7 p.i. (1 :640) con un pico máximo a día 25 (1 :5120) manteniéndose con niveles significativos hasta el día 400.

Binaghi & Perrudet-Badoux (1976) empleando también ratas pero, de cepas cosanguíneas Sprague-Dawley y Wistar. Se midieron los niveles de las subclases IgG(a,b,c), IgG1 e IgM, en relación con los valores séricos preinfestación, del día 18 a 48 p.i.. Los niveles de IgG e IgM estaban elevadas a día 48 en las ratas Sprague-Dawley, mientras que en las ratas Wistar fue más temprana (a día 18), manteniéndose elevada a lo largo de la

prueba. Al medir la IgE total observaron un incremento en ambas cepas a día 18 p.i., sin embargo los títulos de PCA específicas estaban incrementados en ambas, a día 48 p.i..

Vos y col., (1983) midieron por ELISA los títulos de IgG e IgM sobre sueros recogidos de ratas rnu/rnu y rnu/+ Hooded, a las que se les había administrado 1000 larvas, por vía oral. Además midieron la IgE por PCA. Los títulos positivos de ELISA de las ratas rnu/+ , comenzando a día 10 p.i. y se mantuvieron hasta el día 28 p.i.. Los títulos de PCA se detectaron a día 14 y siguieron aumentando hasta día 28. No se detectó ninguna clase de anticuerpos en las ratas rnu/rnu durante el experimento. En las ratas rnu/+ se detectó en primer lugar la clase IgM, y a continuación la IgG. Los títulos de ELISA en ambas clases se mantuvieron sin cambios a lo largo del estudio.

Bell y col., (1983) midieron la respuesta de anticuerpos frente a los antígenos metabólicos del adulto (ES), en ratas LBN, por radioinmunoensayo, variando el tamaño del inóculo de larvas. Las ratas a las que se les administró 200 larvas tenían títulos de 0 (día 7) , 252 (día 10), 317 (día 14) y 1270 (día 18), mientras que las ratas inoculadas con 5000 larvas presentaban títulos de 1008, 1008, 2540 y 1270, respectivamente. (Despommier, 1987).

Takahashi y col., (1990b) realizaron un análisis cronológico de las clases específicas de anticuerpos frente a *Trichinella*, en ratas Fischer, analizando cada uno de los componentes de los órganos del parásito. Llegaron a la conclusión de que no todos los anticuerpos aparecen al mismo tiempo en el suero del hospedador y que la IgM parece reconocer

un espectro más estrecho de antígenos que las IgG. En las ratas infestadas, las IgG contra la superficie de la cutícula, los gránulos del esticosoma, y la ESO (sustancia que ocupa el esófago), aparece cuatro semanas más tarde que los que aparecen frente a la capa más interna de la cutícula, hipodermis, hemolinfa, agregados de glucógeno, áreas discretas de las células del primordio genital, gránulos de la glándula intestinal y gránulos de la cuerda hipodérmica. A los primeros se les designa como grupo de respondedores lentos y los últimos como respondedores rápidos. La misma tendencia se aprecia en la clase IgM, de forma que en los respondedores lentos, aparece 2 semanas más tarde que la de los respondedores rápidos, y además se mantiene durante mucho tiempo (32 semanas) para los respondedores lentos frente a una respuesta breve en los respondedores rápidos (8 semanas). Esto reflejaría una diferente dinámica para cada componente antigénico durante el ciclo biológico de *Trichinella*. Este mismo autor (Takahashi y col., 1991) señala que los patrones de reconocimiento antigénico, la clase de anticuerpos y el tiempo de aparición de los mismos en ratas, son muy similares a los humanos.

CICLO BIOLÓGICO DEL PARÁSITO

RESPUESTA DEL HOSPEDADOR

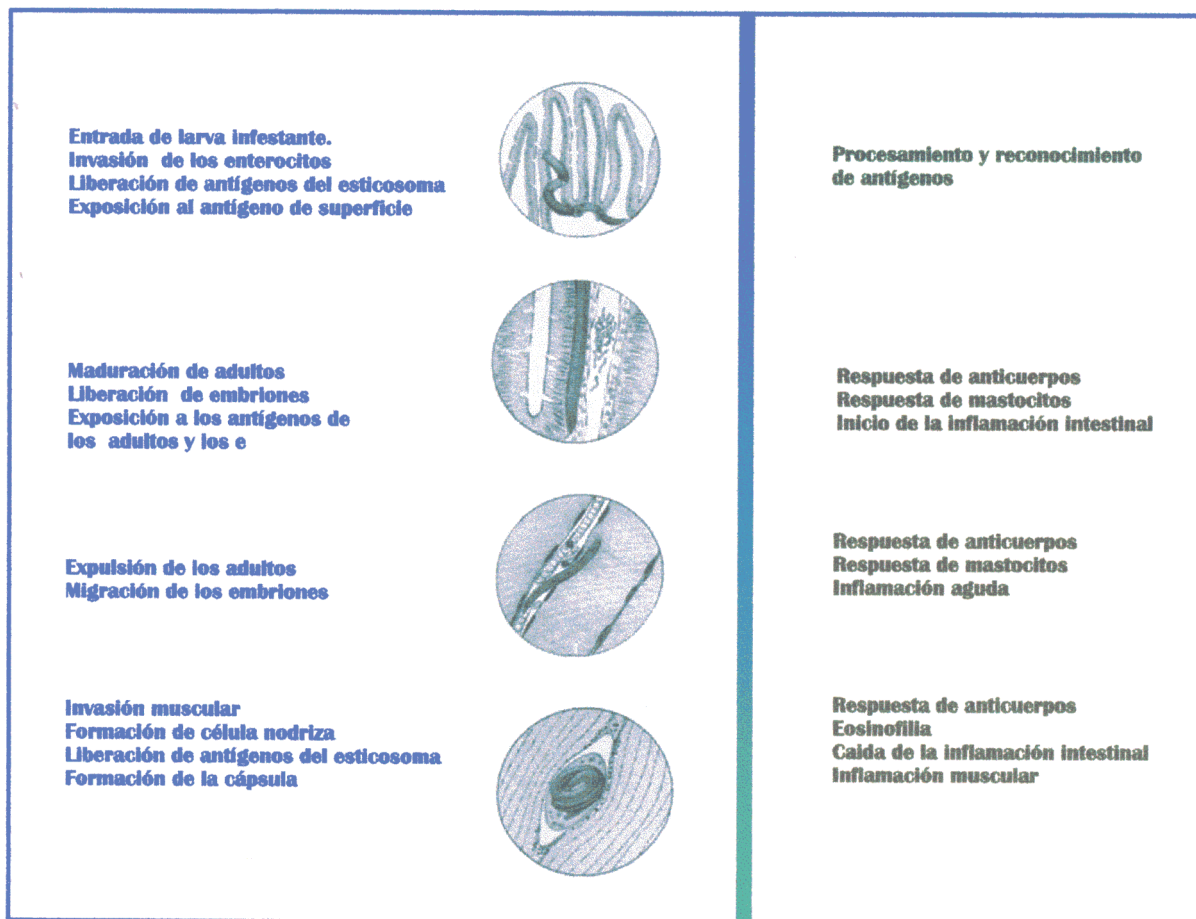


Figura 10. Esquema de los estadios involucrados en el ciclo biológico de *T. spiralis* y las respuestas inmunes e inflamatorias en el hospedador murino. Tomado de Wakelin (1993).

VII. CRITERIOS DE ESPECIACIÓN

El principal problema de la taxonomía de *Trichinella* es la semejanza morfológica de sus especies. De acuerdo con Dobzhansky (1951), "el proceso de especiación se basa en el desarrollo de mecanismos de aislamiento reproductivo, y especies son por lo tanto, grupos de poblaciones cuyo intercambio genético está limitado o impedido en la naturaleza por estos mecanismos de aislamiento". En esta misma línea, Dick (1983a) propone el concepto de especie como un conjunto de poblaciones naturales que comparten un grupo de genes y están reproductivamente aislados de otras poblaciones ; y el concepto de aislamiento como los individuos de una población aislada en un lugar y tiempo determinados y mantenidos posteriormente por medio de pases sucesivos, en animales de experimentación.

La aplicación del concepto biológico de especie en el género *Trichinella*, basado en los caracteres morfológicos o fisiológicos, no ha sido suficiente para caracterizar la composición de este taxón, sin embargo el desarrollo y aplicación de nuevas técnicas dentro del campo de la bioquímica y la genética han permitido discernir, al menos parcialmente, la sistemática de este género. A continuación recogemos los criterios más frecuentemente utilizados para definir aislados y especies.

7.1. CRITERIOS MORFOLÓGICOS

La existencia de variaciones morfológicas dentro de las especies de nematodos parásitos está bien documentada y probablemente sea un reflejo de variaciones genotípicas. Numerosos autores han empleado criterios morfológicos para intentar distinguir posibles especies de *Trichinella* ; entre los

que se encuentran: Arakawa & Todd (1971); Schad y col., (1967); Garkavi (1972); Bessonov y col., (1975); Garkavi & Gineev, (1976); Sukhdeo & Meerovitch (1977); Barus y col., (1979); Belosevic & Dick (1979); Boev y col., (1979); Shaikenov (1980); Belosevic & Dick (1980a); Armas Serra y col., (1989); Stewart (1989) y Mikhail y col., (1994), y ciertas características, como el tamaño, han permitido diferenciar *T. pseudospiralis* del resto de las especies (además de no formar cápsula quística), al presenta un menor tamaño en todas las fases del ciclo biológico. Sin embargo, tales diferencias no son tan evidentes entre los aislados quísticos, por lo que la mayoría de los investigadores no han tenido éxito a la hora de emplear estos criterios a nivel taxonómico.

7.2. CRITERIOS BIOLÓGICOS

Las primeras observaciones que hicieron cuestionar la homogeneidad de *Trichinella* fueron las diferencias encontradas en la infestabilidad de los distintos aislamientos. A partir de ahí, se desarrollaron numerosos trabajos donde se analizaba la existencia de otras posibles variaciones en parámetros del ciclo biológico tales como el asentamiento intestinal, fertilidad de los adultos o la distribución y longevidad en intestino y músculo.

7.2.1. ASENTAMIENTO INTESTINAL

El asentamiento intestinal es un parámetro biológico que se define como el número o porcentaje de larvas de *Trichinella* que consiguen instalarse en el intestino del hospedador y alcanzar en él la madurez sexual. Han sido numerosos los autores que, con el fin de encontrar diferencias útiles en la caracterización y diferenciación de posibles variantes intraespecíficas,

han estudiado este parámetro sobre distintas poblaciones de *Trichinella*, procedentes de diversos hospedadores.

Forrester y col., (1961) ; Nelson & Mukundi (1963) y Kozar & Kozar (1965), observaron que un aislado de *Trichinella* encontrado en Kenia era mucho menos infestante para roedores y cerdos domésticos, que aquellos procedentes de Europa y América. Posteriormente Nelson y col., (1966) y Read & Schiller (1969) ampliaron este tipo de estudios a aislados de origen ártico, observando que ratas, ratones y cricetos eran relativamente refractarios a un aislado procedente de Alaska. Siguiendo en esta misma línea, Siddiqi & Meerovitch (1977b), compararon los niveles de asentamiento intestinal en rata de cuatro aislamientos de *Trichinella* de distintos orígenes (Canadá, Kenia, India y Alaska), observando que las ratas infestadas con el aislado India eran las que tenían un mayor porcentaje de adultos intestinales a día 7 p.i. (31,7%), seguido del Alaska (29,2%), Canadá (24,8%) y por último el Kenia (16,7%).

Martínez Fernández & Sanmartín Durán (1980) llevaron a cabo trabajos similares, pero con aislados encontrados en España. Estudiaron el comportamiento de dos poblaciones de *Trichinella*, (GM-1 y C-76) en comparación con dos aislados foráneos (Boev y Garkavi), observando que, a día 3 p.i. la cepa de origen ártico (Boev) era la que presentaba el mayor nivel de asentamiento intestinal (73%), mientras que para el aislado C-76 sólo detectaron un 36,7%. Posteriormente Armas-Serra (1983), empleando los mismos aislados, pero con ratones como hospedador experimental, observó que, a día 6 p.i., el aislado C-76 presentaba mayor número de adultos asentados en intestino (73,48%) que el aislado Boev (40,31%).

Sin embargo, la validez de este parámetro como criterio diferenciador de poblaciones ha sido reiteradamente cuestionada, de forma que unos autores indican que es una característica biológica que está fuertemente influenciada por diversos factores, mientras que otros indican que es un carácter más o menos constante para cada aislamiento o aislado.

Schad y col., (1967) encontraron que el grado de asentamiento intestinal en el hospedador experimental, aumentaba a lo largo de pases sucesivos, para ello utilizaron un aislado procedente de Canadá y otro de India, de forma que en un primer pase, los niveles de asentamiento eran del 27% y del 14% respectivamente, y al hacer varios pases sucesivos por el mismo hospedador, estos porcentajes aumentaban en un 65% y 61% respectivamente, atribuyendo este fenómeno a una posible adaptación del parásito al nuevo hospedador.

En 1971, Arakawa & Todd, compararon el desarrollo biológico en ratones de cuatro aislados, dos árticos y otros dos de origen templado, observando que a nivel intestinal, las variedades árticas presentaba una capacidad infestante intestinal significativamente inferior a las poblaciones de origen templado (3,9 y 2,6% frente a 18,8 y 39,2%), pero tras pases sucesivos por ratón, ambas poblaciones aumentaban su grado de asentamiento intestinal, hasta incluso llegar a igualarse (76 y 80% para las árticas y 67,7 y 79,7% para las templadas), interpretando este fenómeno al igual que los autores anteriores como una adaptación del parásito a este hospedador.

Este comportamiento no parece ser detectado por otros autores, así Belosevic & Dick (1979), al analizar dos aislados uno procedente de cerdo (templado) y otro de oso polar (ártico) en ratones COBS CFW, observaron que los niveles de asentamiento de ambas poblaciones variaba a lo largo de pases

sucesivos, pero que los valores eran muy similares para cada uno, y que en cualquier caso, los animales infestados con el aislado de cerdo presentaban un mayor número de adultos que los del aislado de oso polar, hecho que explicaban, no por una posible adaptación al hospedador, sino por ser el ratón un hospedador experimental mejor para las poblaciones de origen templado. En este mismo sentido Chadee & Dick (1982a y b) afirmaron que este parámetro es un carácter más o menos estable y predecible para un aislamiento y un hospedador dados. En cuanto a la importancia que tiene el hospedador experimental, estos mismos autores observaron que, infestando con una misma población de *Trichinella* a distintos roedores (tanto de laboratorio como silvestres), el porcentaje de gusanos en intestino a día 5 p.i., variaba desde un 54% en ratones CD-1 hasta un 4% en *Peromyscus maniculatus*, con lo que deducían que esta característica, al igual que el resto de los parámetros biológicos, se ve fuertemente influenciada por el tipo de hospedador. Este hecho fue corroborado posteriormente por Dick (1983b) al infestar mapaches con aislados procedentes de cerdo, oso polar, glotón polar y zorro ártico, obteniendo, en todos los casos, porcentajes de infestación intestinal muy inferiores a los hallados cuando se empleaban ratones como hospedadores experimentales.

Resultados similares fueron encontrados por Bober & Dick (1983) respecto del comportamiento biológico del aislado Garkavi, actual *T.pseudospiralis*, en distintas aves y en ratón, de forma que no solo encontraban que los niveles de asentamiento intestinal en ratón eran superiores a los obtenidos en aves, sino que además observaron que un mismo aislado tenía distinta capacidad infestante para las diversas aves.

En cuanto a la relación sexual o número de hembras presentes en el intestino de los hospedadores con respecto al número de machos, parece ser que todos los autores están de acuerdo en que las hembras de los distintos aislados se asientan en el intestino de los diversos hospedadores en mayor proporción que sus respectivos machos, (Nelson y col., 1966; Arakawa & Todd, 1971; Belosevic & Dick, 1979; Martínez Fernández & Sanmartín Durán, 1980 ; Armas Serra, 1983).

Además de la posible influencia que puede tener sobre el asentamiento intestinal de las distintas poblaciones, el tipo de hospedador experimental y la adaptación del parásito a este, hay autores que afirman que existen otros factores intrínsecos del hospedador que pueden afectar, de uno u otro modo, a este parámetro. Entre ellos cabe destacar :

➤ **Edad del hospedador.**

Crandall (1975) comparando los niveles de infestación intestinal de *T. spiralis* en ratones C₅₇Bl/6J de 16, 22 y 120 días, observó que cuanto más jóvenes eran los hospedadores, más refractarios eran al parásito .

➤ **Sexo del hospedador.**

Reddington y col., (1981) estudiaron la dinámica intestinal de *T. spiralis* en los días 8, 11, 14 y 17 p.i. en ratones CD-1 macho y hembras, observando que en todos los casos los ratones machos presentaban mayor número de adultos intestinales.

➤ **Dieta del hospedador.**

Saowakontha (1975) y Castro & Roy (1974) observaron que las ratas sometidas a dietas con déficit calórico y protéico, son más susceptibles a la

infestación, que los controles alimentados con una dieta normal. Por el contrario Castro y col., (1974), demostraron que ratas hiperalimentadas durante dos días antes de la infestación, presentaban a día 7 p.i., un nivel de asentamiento intestinal inferior al de los respectivos controles.

➤ **Flora intestinal del hospedador.**

Pryzjalkowki ha llevado a cabo diversos estudios a este respecto, (Pryzjalkowki & Golinska, 1978; Pryzjalkowki y col., 1983; Pryzjalkowki & Cabaj, 1983). Así, tanto con *T.spiralis* como *T.pseudospiralis*, en ratones libres de microorganismos encontraba menos adultos a día 5 p.i. que en sus respectivos controles. Por el contrario se asentaban más gusanos en el intestino delgado de ratones libres de bacterias, si previamente había sido colonizado por *E.coli*, *Bacillus mesentericus*, *B.subtilis* o *Pseudomonas aeruginosa*, (Pryzjalkowki, 1968; Pryzjalkowki & Wescott, 1969).

➤ **Niveles de corticoides del hospedador.**

Pawlowski (1967a y b) detectó que, la adrenalectomía previa a la infestación, provocaba en los ratones un descenso en el número de adultos presentes en intestino a día 3 p.i., proceso que era reversible tras la administración de hidrocortisona, cortisona y prednisona.

➤ **Temperatura corporal del hospedador.**

Chute en 1961 estudió el efecto que ejercía la temperatura corporal del hospedador sobre el número de gusanos intestinales, observando un menor nivel de infestación en los cricetos en hibernación que en los respectivos controles. Posteriormente, Lightner & Ulmer (1974) en una prueba similar pero con ratones, vieron que el número de adultos recuperados a día 5 p.i. en animales mantenidos a 8–10° C, durante el proceso de infestación, era

inferior que en los mantenidos a 36° C. Parece ser que en estados hipotérmicos, se reduce el número de adultos y de embriones, posiblemente debido a que las bajas temperaturas reducen los niveles séricos de glucosa, lo que influye en el asentamiento de los parásitos (Lightner & Ulmer, 1974 ; Despommier, 1983).

Otros factores no intrínsecos al propio aislamiento pueden afectar a este parámetro, así ya Kozar & Kozar (1965), indicaron que la gran variación existente, en cuanto al porcentaje de asentamiento intestinal de los distintos aislados de *Trichinella*, no era solo debido al propio aislado, sino que también dependía de la metodología experimental utilizada o de la dosis infestante (Campbell, 1967).

➤ Dosis infestante

Kociecka y col., (1981) determinaron que la dosis infestante también podía influir sobre dicho parámetro, así trabajando con monos, observaron que al administrar 500 larvas/Kg de *T. spiralis* y *T. pseudospiralis*, esta última se asentaba en intestino en mayor proporción a día 5 p.i. (450 gusanos frente a 90) que si la dosis de inóculo era de 100 larvas/Kg (50 frente a 100). Este hecho fué nuevamente confirmado por Golinska & Bany (1983), de forma que si infestaban distintas estirpes de ratones, con 200 larvas de *T. pseudospiralis*, todos presentaban igual número de adultos intestinales, mientras que con un inóculo mayor (500 larvas), el porcentaje correspondiente a la cepa Balb/C era mayor.

7.2.2. DISTRIBUCIÓN INTESTINAL

La distribución a lo largo del intestino delgado de diversos hospedadores es otro de los parámetros biológicos ampliamente estudiados para las distintas poblaciones de *Trichinella*.

Pawłowski & Rauhut (1971), al comparar la distribución intestinal en ratas, de un aislado muy antiguo de *Trichinella* procedente de un cerdo, con la de uno nuevo de cerdo y otro humano, encontraron diferencias a este nivel ; atribuyendo el hecho a un distinto grado de adaptación al hospedador de las poblaciones en estudio, ya que la cepa más antigua, llevaba muchos años mantenida en rata. No todos los autores comparten la misma opinión, Belosevic & Dick (1979) al comparar la cinética intestinal, en ratón, de dos aislados uno procedente de cerdo y otro de oso polar, encontraron que, en ambos casos, los gusanos se localizaban en la mitad anterior del intestino delgado, aunque el aislado de oso polar ocupaba regiones algo posteriores, y que esta diferencia entre aislados se mantenía a lo largo de pases sucesivos, por lo que propusieron la distribución intestinal como parámetro de gran utilidad para la caracterización de aislados de *Trichinella*, definiéndolo como el punto del intestino delgado por delante del cuál se localiza el 50% de la población intestinal.

Posteriormente Chadee & Dick (1982a) estudiaron la distribución intestinal de un aislamiento de *Trichinella*, procedente de un glotón polar a lo largo de 10 pases sucesivos, (ratones COBS CW), observando que se puede considerar como uno de los parámetros biológicos más constante, característico y predecible para un aislado dado en un hospedador determinado.

Por el contrario, hay autores que no encontraron diferencias a este nivel entre las distintas poblaciones de *Trichinella*. Así Sukhdeo & Meerovitch (1980), al comparar la biología en ratón de un aislado procedente de un oso polar de Alaska, otro de cerdo de Canadá y otra de gato silvestre en Kenia, encontraron que no existían diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la localización intestinal de los adultos de estas poblaciones.

Dick (1983a) apuntaba que la posición intestinal de los adultos de *Trichinella* puede ser una característica biológica cuantificable para algunos aislamientos, siempre que se determine sobre un mismo hospedador experimental.

También en este caso hay una serie de factores que pueden afectar a la distribución intestinal :

➤ **Tipo de hospedador**

Existen numerosas evidencias de la influencia del hospedador sobre este parámetro (Roth 1938; Larsh & Hendricks, 1949; Gursh, 1949 ; Boyd & Huston, 1954; Concannon & Ritterson, 1965; Campbell, 1967; Pawlowski & Rauhut, 1971). Chadee & Dick (1982a) observaron que un mismo aislamiento parasitaba distintas zonas del intestino delgado en función del tipo de hospedador, apreciando que en todos los casos se localizaban en la mitad anterior, (ratón SEC-j, Cr1: COBS CD-1; rata Sprague-Dawley; *Mus musculus*), excepto en *Mesocricetus auratus* y *Peromyscus maniculatus*, en los que la región parasitada era la posterior.

➤ **Edad del hospedador.**

Larsh & Hendricks (1949) y posteriormente Campbell (1967) y Dick & Silver (1980), estudiaron la distribución intestinal de las larvas, en función de la edad del hospedador, observando que en ratones jóvenes (24–48 días), el asentamiento de los gusanos era preferentemente en la porción posterior, mientras que en ratones más viejos (130–140 días), la mayoría de los gusanos se encontraban en el tramo anterior del intestino delgado; sin embargo estos resultados son contrarios a los de Rutkowska & Przyjalkowski (1978), quienes observaban que, en los ratones más viejos, los gusanos se encuentran en la porción más posterior del intestino. Panitz (1974), encontró que se asentaban en la primera mitad del intestino cuando utilizaba gerbos viejos como hospedador experimental y en la porción posterior cuando se trata de gerbos jóvenes. Pero en cuanto a la influencia que ejerce la edad del hospedador sobre este parámetro, hay controversias entre los distintos autores, ya que McCracken (1982) infestando ratones de distintas edades, observó que los gusanos se encontraban en la mitad anterior del intestino delgado y no había diferencias significativas entre ratones jóvenes (28–35 días) y viejos (110–130 días).

➤ **Sexo del hospedador.**

Dick & Silver (1980) no encontraron diferencias entre la localización intestinal en ratas hembras y machos.

➤ **Motilidad intestinal del hospedador.**

Sukhdeo & Croll (1981), observaron que al administrar relajantes musculares del intestino, la mayoría de los gusanos se asentaban en la porción anterior del duodeno; mientras que si activaban el peristaltismo, los adultos se encontraban en su mayor parte, en las últimas regiones del intestino.

➤ **Volúmenes de líquido de inóculo.**

Sukhdeo & Croll (1981) evidenciaron que si las larvas iban acompañadas de grandes volúmenes de líquido (0,5 a 1 ml de solución salina) la localización entérica era yeyuno e ileón; mientras que si infestaban en 0,1 ml, los adultos aparecían en duodeno. Además se ha observado que el desarrollo de las larvas hasta adultos en las últimas porciones intestinales (yeyuno e ileon) era óptimo y que las larvas no migraban hacia el duodeno (Dick & Silver, 1980; Bober & Dick, 1983).

➤ **Dosis infestante.**

Sukhdeo & Croll (1981) infestando ratones con 500, 1000 ó 2000 larvas/ratón observaron que, los adultos se situaban en zonas más posteriores, en los ratones inoculados con la dosis más elevada.

➤ **Sexo de las larvas de *Trichinella*.**

En ratones infestados solamente con larvas macho, los adultos se distribuían más irregularmente a lo largo del intestino del hospedador, que en aquellos infestados con larvas hembras o en infestaciones mixtas (Sukhdeo & Croll, 1981).

➤ **Día de la determinación de la distribución.**

En este aspecto hay resultados divergentes entre los distintos autores. Mientras Roth (1938); Concannon & Ritterson (1965), Pawlowski & Rauhut (1971) y Love y col., (1976), observaron que la distribución intestinal iba variando hacia las porciones posteriores a lo largo de la infestación; por el contrario Dick & Silver (1980) encontraron que ésta era constante a lo largo de toda la fase intestinal.

7.2.3. DURACIÓN DE LA FASE INTESTINAL

Los adultos de *Trichinella*, una vez alcanzada la madurez sexual, comienzan la cópula y la puesta de embriones, para posteriormente ser expulsados de su nicho entérico. Este tiempo de permanencia en el intestino o longevidad intestinal es otro de los parámetros biológicos propuesto por Dick (1983b) para ser estudiado en los distintos aislamientos de *Trichinella*, como criterio diferenciador de posibles poblaciones.

Al analizar los resultados obtenidos por los diversos autores se aprecia que la duración de la fase intestinal, es uno de los parámetros biológicos que presentan una mayor variabilidad. Kozar & Kozar (1966) y Dick (1983b), afirma que tales diferencias pueden ser debidas tanto a la cepa estudiada como al hospedador experimental utilizado.

Mientras que Arakawa & Todd (1971); Belosevic & Dick (1979); Sukhdeo & Meerovitch (1980); Chadee y col., (1983), encuentran que los aislados de origen ártico, son eliminados del intestino de ratones antes que los de origen templado, otros autores no comparten dicha opinión. Así Martínez Fernández & Sanmartín Durán (1980) observaron que, a día 11 p.i., todavía había adultos en el intestino de ratas infectadas con un aislado de origen ártico, mientras que aquellas que fueron inoculadas con la cepa GM-1 (*T. spiralis* de origen español) no presentaban ningún adulto. Resultados similares obtuvieron García Díaz y col., (1982), quienes empleando ratones de la estirpe NIH apreciaron que una *T. nativa* desaparecía del intestino el día 18 p.i., mientras que GM-1 (*T. spiralis*) lo hacía a día 14 p.i.

Armas Serra (1983) infestando ratones de la estirpe CD-1 con distintos aislados, encontraron los siguientes resultados en cuanto a la longevidad intestinal: GM-1 (*T. spiralis*) y Garkavi (*T. pseudospiralis*), 13 días, Boev (*T. nativa*) 14 días y 10 días para C-76 (antigua *T. nelsoni* y actualmente denominada como *T. britovi*).

La influencia que pueda ejercer el hospedador sobre la duración de la fase intestinal, ha sido evidenciada en gran número de ocasiones. Matoff (1937) apreció que los gusanos eran eliminados del intestino delgado de perros a los 10 p.i.; mientras que Carter (1949) detectó la presencia de triquinelas en intestino humano a la semana 16 p.i. y Wakelin & Deham (1983), durante al menos 6 semanas. Pero estas variaciones no solamente han sido apreciadas en hospedadores tan dispares; así Kozar & Kozar (1965), observaron que la duración del período intestinal, en una infestación por *Trichinella* en distintas estirpes de ratón, variaba entre 16 y 38 días p.i.. Esto fue posteriormente ratificado por Rauhut (1978), al observar que un mismo aislado de *Trichinella* tenía distintas dinámicas intestinales en diversas cepas de ratón.

Chadee y col., (1983) al determinar este parámetro en ratones CD-1, para distintos aislamientos de *Trichinella* (procedentes de cerdo, oso y glotón polares) y comparar sus resultados con los obtenidos anteriormente por Belosevic & Dick (1979) y Chadee & Dick (1982a), en ratones COBS CFW (SW), observaron diferencias notorias.

Bolás & Wakelin (1989), comparan el asentamiento intestinal de cuatro aislados de *T. spiralis* y uno de *T. nativa*, procedentes de diferentes

hospedadores y localizaciones geográficas en dos cepas consanguíneas de ratones, una rápida respondedora la NIH y otra respondedora lenta, la C57BL/10. Las mediciones se hicieron a día 8 para todos los aislados y mientras en el caso de los NIH, el número de adultos para los aislados T1 era tres veces superior al T2, por el contrario las diferencias no eran tan marcadas en los C57BL/10. Para completar el análisis se llevó a cabo un estudio longitudinal de la fase intestinal a días 2, 6, 9, 12 y 15, observando que para los NIH, el nivel de asentamiento a día 2, era de 229 para T1(S) y de 172 para T2(W). Además, mientras aún había adultos del aislado T1 a día 15 p.i., la expulsión se había completado a día 12 para el aislado T2. En el caso de la estirpe C57BL/10, aunque el nivel de asentamiento de ambos aislados era semejante, se observaba una eliminación más rápida para la T2. De los datos se desprende que un factor importante en la infestabilidad era la respuesta inmunitaria del hospedador y la distinta inmunogenicidad inducida por los diferentes aislados, de forma que la menor capacidad infestante del aislado T2(W) sería consecuencia de la inducción de una fuerte y rápida respuesta inmune que reduciría la reproducción y la supervivencia en el intestino; aunque estos datos no se correspondían con la respuesta por anticuerpos, ya que los ratones infestados con el aislado T1(S), con una carga muscular más elevada, producían niveles de inmunoglobulinas equivalentes a las de los otros aislados, con un menor nivel de asentamiento muscular.

Reddigton y col., (1981), apreciaron que el sexo del hospedador también influye en la longevidad intestinal de las triquinelas, alcanzándose valores superiores de permanencia en ratones macho.

Por otro lado, hay autores que indican que las características propias del aislado, como por ejemplo la edad de éste, también pueden provocar variaciones significativas a este nivel, ya que se han detectado notables

diferencias en la duración de la fase intestinal, en infestaciones producidas por cepas “viejas” o “jóvenes” de *T. spiralis* (Pawlowski & Rauhut, 1971).

En cuanto a, si la expulsión de machos y hembras de *Trichinella* es simultánea o no, existen disparidad de opiniones. Belosevic & Dick (1979), indicaron que los machos y hembras de *Trichinella* son expulsados a la vez del intestino de ratones COBS CFW (SW), tanto en un aislamiento de cerdo como en otro de oso polar. Del mismo modo, Chadee & Dick (1982a) corroboraron este hecho, apreciando que la relación sexual en el caso del aislado procedente de glotón polar, se mantenía más o menos constante a lo largo de toda la infestación intestinal en ratones COBS CFW (SW). Por el contrario, hay otros autores que señalan que las hembras son expelidas antes que los machos (Rappaport, 1943; Gursh, 1949; Denham & Martínez, 1970). Posteriormente Martínez Fernández & Sanmartín Durán (1980), determinaron en ratas infestadas con una serie de aislados (GM-1; C-76; Boev y Garkavi) la relación sexual durante distintos días de la infestación; apreciando que ésta iba disminuyendo a lo largo de la fase intestinal, hasta llegar incluso a invertirse, concluyendo por tanto que el número de hembras decrecía más rápidamente que el de machos. Por el contrario, Armas Serra (1983) trabajando con los mismos aislados, observó que mientras los machos y las hembras de GM-1 y Boev eran expulsados a la vez del intestino de ratones CD-1, en las infestaciones con Garkavi y C-76 la relación sexual si se invertía. Campbell y col., (1982), apreciaron tanto en ratones como en hurones, que la longevidad intestinal de las hembras era muy inferior al de los machos. En este mismo sentido Britov (1983) destacó que en distintas poblaciones de *Trichinella*, las hembras adultas son expulsadas del intestino de los hospedadores, antes que los machos.

7.2.4. ASENTAMIENTO MUSCULAR E ICR

Numerosos autores han determinado los niveles de asentamiento muscular de algunos aislamientos de *Trichinella* o número de larvas que logran instalarse en los músculos de distintos hospedadores.

Bessonov y col., (1975a) apreciaron que un aislado de cerdo y otro de mapache infestaban de forma similar al ganado porcino. Sin embargo Siddiqi & Meerovitch (1976a y b), comprobaron que un aislado procedente de una civeta de la India, era más infestante para el ratón y la rata que otra procedente de un cerdo de Canadá. Así mismo, Martínez Fernández & Sanmartín Durán (1980) al comparar los niveles de infestación muscular en rata, de las cepas C-76, GM-1 y Boev, observaron que la más infestante para este hospedador era esta última (7,842 I/g), seguida de GM-1 (1,943 I/g) y C-76 (155,3 I/g). Por el contrario García Díaz y col. (1982), observaron que para ratones NIH, la más infestante era *T.spiralis*, seguida de *T.nativa* y *T.nelsoni* (actual *T. britovi*).

Algunos autores han intentado dar una explicación de carácter inmunológico a las diferencias en el asentamiento muscular que presentan los distintos aislados de *Trichinella*. Nelson y col., (1966) afirmaron que el grado de infestación de algunas poblaciones era inferior al de otras porque inducían en el intestino del hospedador una mayor respuesta inmunitaria, lo que provocaría una notable expulsión de los adultos intestinales, con lo que se produciría una menor producción de embriones. Sin embargo, Perevertzeva (1966) indicó que las triquinelas menos infestantes son las que inducen en el músculo del hospedador una respuesta inmunitaria mayor, provocando una considerable destrucción de las larvas musculares.

Por el contrario, Sukhdeo & Meerovitch, (1980), atribuyeron estas diferencias de capacidad invasora, a caracteres biomorfológicos del parásito y no a diferencias inmunitarias. Así, al comparar la biología de tres aislados de distinta procedencia (ártico, templado y tropical), apreciaron diferencias en cuanto al grado de infestación muscular, no relacionándolas con la magnitud de la respuesta inflamatoria a nivel intestinal. Además, el aislado que provocaba una mayor reacción inmunitaria en el músculo era también el más infestante. Estos resultados llevaron a estos investigadores a proponer las siguientes características biomorfológicas para explicar la variabilidad en la capacidad invasora de *Trichinella*:

- Los adultos de los distintos aislamientos abandonan el intestino delgado a diferentes tiempos.
- El orden de desaparición del nicho intestinal está en relación directa con la infestabilidad del aislado (el menos infestante es el primero en abandonarlo).
- El tamaño del útero de las hembras está relacionado con la capacidad invasora (el aislado con el útero mayor es también el más infestante).

Nuevamente hay discrepancias entre los distintos autores sobre el hecho de que el grado de infestación muscular sea una característica biológica constante. Mientras unos afirman que es un carácter que depende del grado de adaptación del parásito hacia un hospedador determinado, otros indican que es una característica más o menos constante para un aislamiento dado en un mismo hospedador, y que por lo tanto será de gran utilidad en la caracterización de las distintas poblaciones de *Trichinella*.

Kozar & Kozar (1965), apreciaron variaciones en el grado de infestación de un aislado procedente de Kenia, aunque no se mantenían constantes a lo largo de pases sucesivos. Posteriormente Arakawa & Todd (1971), al comparar el asentamiento intestinal y muscular de aislados de origen ártico y templado, observaron que los primeros eran mucho menos infestantes para ratón blanco, pero tras cuatro pases sucesivos, los niveles de infestación muscular eran casi iguales, interpretando este comportamiento como una medida relativa de la adaptabilidad incrementada de *Trichinella* a su nuevo hospedador.

Por el contrario, Siddiqi & Meerovitch (1976a y b; 1977a y b), al realizar un análisis comparado en rata de la infestabilidad de aislados de *Trichinella* procedentes de India, Kenia, Senegal, Alaska y Canadá (norte y sur) encontraron que las cepas menos infestantes eran las de procedencia ártica y tropical (Siddiqi y Meerovitch , 1976 a y b). Señalando en trabajos posteriores que el empleo de otro hospedador menos refractario que la rata, suponía un aumento de la capacidad infestante para los aislados africano y ártico, si bien, siempre resultaban ser significativamente inferiores a las obtenidas para las cepas templadas; así mismo observaron una elevada estabilidad del grado de infestación, que no se modificaba en los pases sucesivos a través de un mismo hospedador (Siddiqi & Meerovitch, 1977a y b).

Estas observaciones coinciden con las de Bessonov y col., (1975a), quienes apreciaron que *T. pseudospiralis* aumentaba su nivel de asentamiento muscular tanto en cerdo como en gato y rata, a lo largo de pases sucesivos, pero siempre era inferior que el de *T. spiralis* para estos mismos hospedadores.

Otros autores que han desarrollado una importante labor en el estudio comparado de las fases intestinales y musculares entre aislados de *Trichinella* han sido Belosevic & Dick (1979). Estos autores, expresaron el grado de asentamiento muscular en función del "Índice de Capacidad Reproductiva" o I.C.R. que se define como el cociente entre el número de larvas musculares recuperadas y el número de larvas inoculadas. Así mismo comprobaron que se trataba de una característica biológica relativamente estable para cada aislado y que no variaba en los pases sucesivos, a través de un mismo animal de experimentación.

Posteriormente Chadee & Dick (1982a) y Leiby y col., (1985) corroboraron este hecho, ya que observaron que el I.C.R. de un aislado procedente de glotón polar, no sufría variaciones estadísticamente significativas tras diez pases sucesivos por ratones COBS CFW (SW), y que las pequeñas fluctuaciones que aparecían eran de rango superior a las que mostraban los aislados procedentes de cerdo y oso polar, atribuyendo este hecho a una menor estabilidad genética de esta *Trichinella*, o bien a que pudiera tener componentes de dos poblaciones distintas.

Sin embargo, otros autores parecen reacios a considerar este dato biológico como una propiedad representativa en la caracterización de aislados, ya que la influencia del hospedador actúa sobre los caracteres fenotípicos en la interacción hospedador-parasito (LoVerde y col., 1985) y creen más útil el análisis genético para la caracterización de aislados, así Minchella y col., (1989) además de realizar un análisis con sondas de ADN realizan un estudio de la I.C.R. en dos hospedadores diferentes, ratones blancos de la cepa ICR y en ratones silvestres (*Peromyscus leucopus*), sobre 20 aislados de *Trichinella* recogidos de la fauna salvaje de Indiana. De los

resultados se desprendía que los I.C.R. eran bastante variables entre ambos hospedadores, ya que la mayoría de los aislados presentaban un I.C.R. 10–30 veces más elevado en ratones silvestres que en los de laboratorio.

Belosevic & Dick (1980a) y Chadee & Dick (1982a) señalaron que, al igual que el resto de las características biológicas, el I.C.R. puede verse influido por el tipo de hospedador elegido para la prueba. En este sentido observaron distintos niveles de infestación para los mismos aislados en diferentes animales de experimentación ; destacando el hecho de que, en todos los roedores de laboratorio, los aislados procedentes de animales silvestres, se asentaban en menor número que los procedentes de cerdo. Por otro lado, las mayores diferencias de infestabilidad entre las distintas poblaciones, aparecían cuando se utilizaban ratas como animal de experimentación, hecho posteriormente confirmado por Britov (1985).

La influencia que tienen los caracteres genéticos del hospedador sobre la biología del parásito, resulta ser más evidente si se compara el I.C.R. de un aislado en un hospedador determinado, con la larviposición *in vitro*. En este sentido Chadee & Dick (1982a), observaron que el I.C.R. de un aislado procedente de glotón polar era de 3 en rata, 22 en ratón SW y 31 en *Mus musculus*, pero el número de embriones puestos *in vitro* por las hembras aisladas a día 7 p.i. del intestino delgado de estos mismos hospedadores, era similar (29, 30 y 38 respectivamente). Por tanto las diferencias en los I.C.R. reflejan más claramente los aspectos biológicos de los distintos aislamientos, así como las diversas interacciones con el sistema inmune del hospedador.

Bolás & Wakelin (1989) determinaron el I.C.R. en 5 aislados procedentes de distintos hospedadores y orígenes geográficos, cuatro que se

consideraban como *T.spiralis* y uno como *T.spiralis* var *nativa*, en dos cepas de ratones, unos respondedores rápidos, NIH y otros respondedores lentos, C57BL/10. En la etirpe NIH, el I.C.R. de los aislados *T.spiralis* oscilaba entre 152 y 133 mientras que era solo de 14 para *T.nativa*. Detectaron el mismo tipo de comportamiento en el caso de los C57BL/10, aunque aquí el valor de la I.C.R. se incrementaba de forma, que para los aislados *T.spiralis* oscilaba entre 256 y 316, siendo de 76 para *T.nativa*. Sin embargo, cuando se sometió a un tratamiento inmunosupresor a los animales se incrementó significativamente la supervivencia de *T.nativa*, por lo que los autores apuntaron que la respuesta inmune debía ser un componente fundamental en el grado de infestación.

Dick (1983c) encontró que cuatro poblaciones procedentes de la misma zona geográfica (Ártico) e idéntico hospedador natural (zorro ártico) presentaban distintos valores de I.C.R. ($36,53 \pm 17,66$; $14,64 \pm 10,78$; $17,02 \pm 7,86$; $8,82 \pm 8,90$), concluyendo que el I.C.R. es un parámetro biológico característico, reproducible y predecible en un mismo hospedador y para un determinado aislado. Este hecho había sido anteriormente denunciado por Mascaró Lazcano (1979), ya que al comparar los niveles de infestación de dos poblaciones de *T.spiralis*, procedentes de cerdo (Laso aislada en 1959 y Pole aislada en 1974) y mantenidas durante años en ratón, observó que presentaban diferentes capacidades invasoras, siendo el aislado más antiguo el más infestante.

En cuanto a la edad del hospedador, Crandall (1975) observó que los ratones más jóvenes son menos susceptibles a la infestación muscular que los más viejos. Al infestar ratones de 4 y 22 meses de edad respectivamente, con

100 larvas de *T. spiralis* apreció que el I.C.R., en los más jóvenes era de 121,15 mientras que en los más viejos era de 418,70.

Así mismo, Manku & Hamilton (1972) y Reddington y col., (1981), estudiaron como afectaba el sexo del hospedador a este parámetro biológico, observando que tanto las ratas como los ratones hembras eran más refractarias a *Trichinella* que los machos. Apreciando además que si se administra testosterona a ratas hembras, se logran I.C.R. idénticos al de los machos; mientras que si a éstos se les administra estilbestrol, el número de larvas musculares es inferior al de sus controles (Manku & Hamilton, 1972).

En cuanto a la importancia de la dosis infestante Ooi y col., (1986) han apuntado que un incremento en la misma, no determinaba, en rata, el aumento de la capacidad invasora de un aislado procedente de oso polar; siendo el ICR en ratas inoculadas con 1.000, 3.000 y 6.000 larvas, de 109, 121 y 99, respectivamente. Así mismo, Campbell & Yastis (1969) encontraron que cuando inoculaban una sola pareja de triquinas, había proporcionalmente más larvas musculares a los 30 días p.i. que cuando la dosis infestante era de 200 larvas/ratón.

Los estudios isoenzimáticos que culminaron en el establecimiento de ocho especies (La Rosa y col. 1992 ; Pozio y col. 1992b) se acompañaron con la caracterización biológica de los 40 aislados utilizados (Pozio y col. 1992a). Diez pertenecían a T1, ocho a T2, once a T3, dos a T4, dos a T5, tres a T6, dos a T7 y dos a T8. Las pruebas biológicas consistían en la determinación de la larviposición *in vitro*; tiempo de formación del quiste; I.C.R. en ratas Wistar y en pollos, y por último pruebas de resistencia a la congelación. Posteriormente los autores aplicaron un análisis estadístico factorial de

correspondencia para analizar la relación entre aislados empleando solo, como variables las pruebas biológicas. Al analizar los I.C.R. se observaba que los aislados T1 mostraban, en ratas Wistar, la mayor infestabilidad, con valores entre 185 y 237 ; seguidos de los aislados T4 con valores de 47-62, mientras que el resto de las especies presentaban I.C.R. extremadamente bajos (entre 0.02 y 0.97). El análisis estadístico mostraba la existencia de diferencias significativas entre T1 y el resto de los grupos ; de T2 frente a T3, T4, T5, T7 y T8 ; de T3 frente a T4 y T6 ; de T4 frente T5, T6 ,T7 y T8 ; de T5 frente a T6 y de T6 frente a T7. Resaltando que solo los aislados de T4 fueron capaces de infestar a pollos.

7.2.4. LARVIPOSICIÓN *IN VITRO*

La determinación del número de embriones puestos por las hembras adultas, mantenidas *in vitro* durante 24 horas, fue usado inicialmente para la evaluación de los niveles de inmunidad en la triquinelosis (Despommier y col., 1977); y posteriormente para la caracterización de variantes intraespecíficas.

Belosevic & Dick (1979), compararon los ritmos de larviposición *in vitro* de hembras aisladas de ratones COBS CFW (SW), infestados con dos poblaciones distintas, observando que el aislamiento procedente de cerdo era más fértil que el de oso polar; siendo el máximo día de puesta de embriones para el primero el 7° p.i. con 56 embriones/hembra/día, y para el de oso polar era el 5° p.i con 22 embriones/hembra/día.

Así mismo, Dick & Chadee (1981), encontraron diferencias en el número de embriones puestos *in vitro* por hembras de aislados de cerdo, oso polar y glotón polar, recuperadas del intestino delgado de ratones COBS CFW

(SW) a día 7 p.i. ; así mientras que las procedentes de cerdo ponían $56,44 \pm 14,82$ embriones/hembra/ día ; las de oso polar y las de glotón solo, $20,66 \pm 6,4$ y $30 \pm 7,2$, respectivamente.

Posteriormente Chadee & Dick (1982a) estudiaron las posibles variaciones que podía tener este parámetro a través de sucesivos pases por un mismo hospedador experimental, apreciaron que a lo largo de 10 pases consecutivos, el número de embriones puestos *in vitro* por las hembras recogidas de ratones COBS CFW (SW) y procedente de un aislado de glotón polar, a día 7 p.i., variaba muy poco, oscilando, los valores entre $16,76 \pm 9,98$ y $32,22 \pm 11,26$. Por ello consideraron este parámetro como otra de las características biológicas más o menos constantes y predecible para un aislamiento de *Trichinella* determinado, en un mismo hospedador. Estos mismos autores apreciaron que las hembras de un mismo aislado recogidas a día 7 p.i. del intestino de diferentes roedores y mantenidas *in vitro* del mismo modo, ponían un número similar de embriones excepto cuando se empleaba como hospedador *Mesocricetus auratus*, caso en que el número de embriones recogidos era superior.

Stewart y col., (1980), estudiaron los posibles factores que podían influir en la puesta de embriones ; así comprobaron que el número de hembras por pocillo y la ausencia o presencia de machos en el mismo no afectaba a la producción de embriones, no ocurriendo lo mismo con respecto al sexo, edad y alimentación del hospedador del que se aislaban las hembras, así como la región del intestino de la que se recuperaban los gusanos, apreciando que:

➤ Las hembras aisladas de ratones machos, ponen mayor número de *embriones que aquellas recogidas del intestino de ratones hembra*. Y además las triquinas recogidas de ratones machos jóvenes eran más fértiles que las recuperadas de machos de más edad; mientras que en el caso de los ratones hembra, la edad de estas no influía en la producción de embriones.

➤ El número de embriones puestos por hembras aisladas de ratones que llevaban doce horas sin comer era menor que sus respectivos controles.

➤ Aquellas triquinas recogidas de la parte posterior del intestino delgado del hospedador producían menor número de embriones que las aisladas de las regiones anteriores.

En el estudio de larviposición llevado a cabo por Pozio y col. (1992) sobre 40 aislados previamente caracterizados por isoenzimas en 8 grupos distintos determinaron el número de embriones puestos por las hembras recogidas a día 6 p.i., del intestino de ratas inmunosuprimidas con cortisona y rayos-X. En este caso los aislados pertenecientes al grupo T1 fueron los más productivos con una media de 110 ± 2.6 embriones liberados por hembra. Los aislados de T2, T5 y T8 fueron los que presentaron la producción más baja con 29.8 ± 2.0 ; 30.6 ± 1.9 y 26 ± 2.6 embriones por hembra respectivamente. Los aislados pertenecientes a T3 y T7 tenían valores similares 47.4 ± 1.2 y 47 ± 3.2 respectivamente. En el caso de T4 fue de 48.5 ± 3.1 similar a T3 y T7. En el caso de T6 fue 59.7 ± 1.5 . La t de Student mostraba valores significativos a 24 horas para T1 frente al resto de los grupos; T2 frente a T3, T6, T7 y T8; T3 frente al resto de los grupos; T4 frente T6; T5 frente a T6 Y T6 frente a T8. A 48 horas la t de Student daba como resultado que T1 frente al resto de los aislados, T2 y T4, T5, T6 y T8; T3 y T4, T5, T6, T8; T5 y T6; T6 y T8. En el caso de las 72 horas, daba como resultado T1 frente a T2, T3, T5, T6, T7 y T8; T2 frente a T3; T4; T3 frente a T5, T6 y T8.

7.3. RESISTENCIA A LA TEMPERATURA

7.3.1. RESISTENCIA A LA CONGELACIÓN

El fenómeno de resistencia a la congelación fue descrito por primera vez en 1950, cuando Brandley & Rausch aislaron en el Ártico larvas viables de *Trichinella* de músculo congelado. Desde entonces numerosos autores han obtenido aislados procedentes de músculos congelados de diversos hospedadores como Clark y col., (1972); Worley y col., (1976), Dick & Belosevic, (1978); Dies (1980); Henricksen (1981); Chadee & Dick (1982a); Kjos-Hanssen (1983); Smith (1984–1985). Estos hallazgos hicieron pensar a diversos investigadores en la posibilidad de que ciertas poblaciones de *Trichinella* podían ser capaces de resistir las temperaturas de congelación. Respecto a la validez de este parámetro como característica diferencial entre especies, no todos los autores están de acuerdo. Mientras que para algunos es un carácter innato de determinadas poblaciones de *Trichinella* (Dick & Belosevic, 1978; Sokolova, 1978 y 1979; Hulinska y col., 1985; Britov, 1985); otros afirman que existen una serie de factores extrínsecos (especie de hospedador, edad del quiste muscular, metodología empleada en la congelación), que condicionan el grado de resistencia a la congelación (Blair & Lang, 1934; Smith, 1975, 1984–1985; Zimmerman y col., 1985).

➤ Estructura genética del parásito

Sokolova, (1978 y 1979) comparó la estabilidad de las cuatro especies descritas hasta ese momento (*T.nativa*, *T.nelsoni*, *T.spiralis* y *T.pseudospiralis*) frente a temperaturas de congelación, observando que *T.nativa* era capaz de resistir 134 días a $-12/-17^{\circ}\text{C}$, mientras que *T.pseudospiralis*, *T.spiralis* y *T.nelsoni* solo resistían 3, 4 y 6 días,

respectivamente. Posteriormente Boev y col., (1979) determinaron que *T.nativa* era doce veces más resistente a la congelación que el resto de las triquinas. A tenor de los resultados obtenidos Britov, (1983 y 1985) señaló que la enorme resistencia a la congelación (-10°C durante un año y medio o a -20°C durante dos meses) es una característica propia de *T.nativa*, probablemente como consecuencia de la adaptación de esta especie a las condiciones climáticas de la zona geográfica de origen. Sin embargo, diversos autores han señalado la existencia dentro de esta especie de estirpes con distinto grado de resistencia a la congelación (Hulinska y col., 1985 ; Bolás y col., 1987 y Martínez-Fernández y col., 1996) e incluso Worley y col., (1990) han propuesto la existencia, de una población de *T.spiralis nativa sic* no resistente a la congelación, ya que al intentar identificar una triquinela de zorro de Montana por medio de una sonda específica pBP2 para *T.spiralis spiralis sic*, al no hibridar con la misma, consideraron a dicho aislado como *T.spiralis nativa sic*. Sin embargo tras la congelación del músculo del zorro durante 1 y 2 meses a $-20^{\circ}\text{C}/-30^{\circ}\text{C}$ no se pudo aislar ninguna larva muscular viva. Posteriormente se comparó el mapa de restricción de ADN de este aislado con otro obtenido de un zorro de una zona cercana de Canadá, cuya resistencia a la congelación había sido establecida previamente (Dies, 1980), observando variaciones entre los dos patrones, que quedaban patentes por la ausencia de tres bandas en el aislado resistente a la congelación.

Pozio y col. (1992b) señalan que ninguno de los aislados fue altamente resistente a la congelación en músculo de ratón. Resumimos, en la siguiente tabla los resultados de resistencia a la congelación, expresados en forma de horas tras la congelación de las canales a -30°C .

Especie	<i>T.spiralis</i>	<i>T.nativa</i>	<i>T.britovi</i>	<i>T.pseudos</i>	T5	T6	<i>T.nelsoni</i>	T8
Horas	12	48	24	12	12	36	12	12

En un trabajo posterior Pozio y col., (1994), comparan la resistencia frente a dos temperaturas de congelación (-10° y -30°C), para lo que emplean un numero más reducido de aislados, de forma que nuevamente observan que la especie más resitente era *T.nativa*, seguida de T6, *T.britovi*, T5, *T.spiralis*, T8, *T.pseudospiralis* y *T.nelsoni*. Encuentran una posible correlación entre la resistencia y la latitud de origen de la especie, de forma que en orden decreciente de resistencia estarían : artico (*T.nativa*) ; subártico (T6), templado (*T.britovi*, T5, *T.spiralis*), subtropical (T8) y tropical (*T.nelsoni*).

➤ Especie del hospedador

Pozio y col., (1994) señalan que en una serie de experiencias de resistencia a la congelación se había observado una pérdida o disminución de este carácter cuando el parásito era mantenido por pases de ratón en el laboratorio ; por ello los autores indican el importante papel que juega la especie del hospedador en la supervivencia de las larvas a bajas temperaturas, y que la adaptación de ciertas especies del parásito a sobrevivir en la carroña, sin la protección de los sistemas homeotérmicos del hospedador, debe haber sido fundamental para la dispersión del parásito. En este sentido Dick & Belosevic (1978) obtienen larvas infestantes a partir de diafragma de oso polar congelado a -15°C durante un año, mientras que el mismo aislado no soportaba más de 7-31 días en la musculatura de rata. De igual forma, Worley y col., (1986) citan una resistencia de 27 meses en larvas conservadas en músculo de oso entre $-6,5^{\circ}$ y -20°C , resistencia que no presentan aislados

recogidos de *Martes pennati*, *Felis concolor* o *Gulo gulo*, a pesar de proceder de la misma zona geográfica. Smith (1984–1985) apreció una disminución de la resistencia de un pase de zorro a hurón. También, Pozio y col., (1989d), en un aislado de zorro, observaron una pérdida de resistencia a la congelación cuando se realizó el pase a ratón. Navarrete y col., (1991) señalan que esta disminución a la resistencia puede ser debida a las características del músculo del hospedador, como masa muscular, concentración de lípidos, condiciones de la congelación, calcificación, etc.,.

➤ **Edad del quiste muscular**

Blair & Lang (1934) encontraron que existía una relación directa entre la edad del quiste y la resistencia de *Trichinella* a las bajas temperaturas, es decir cuanto más viejo era este, más tiempo permanecían las larvas viables. Sin embargo Smith (1975), no apreció tal relación trabajando con *T. spiralis* de forma que, aunque fueran infestaciones viejas, las larvas morían rápidamente. Pozio y col., 1994, por el contrario, señalan que la edad de la larva muscular, que esta relacionada a su vez con el desarrollo de la célula nodriza, influye en la resistencia a la congelación ; y así encuentran un incremento en la resistencia a la congelación cuando se incrementa la edad de la larva de dos a doce meses (especialmente en el caso de los aislados de *T. nativa* en los que pasa de 7–8 a 20–22 días). Señalando además, que la incapacidad de las larvas de *T. pseudospiralis* para sobrevivir a las bajas temperaturas posiblemente se deba a la ausencia de la célula nodriza.

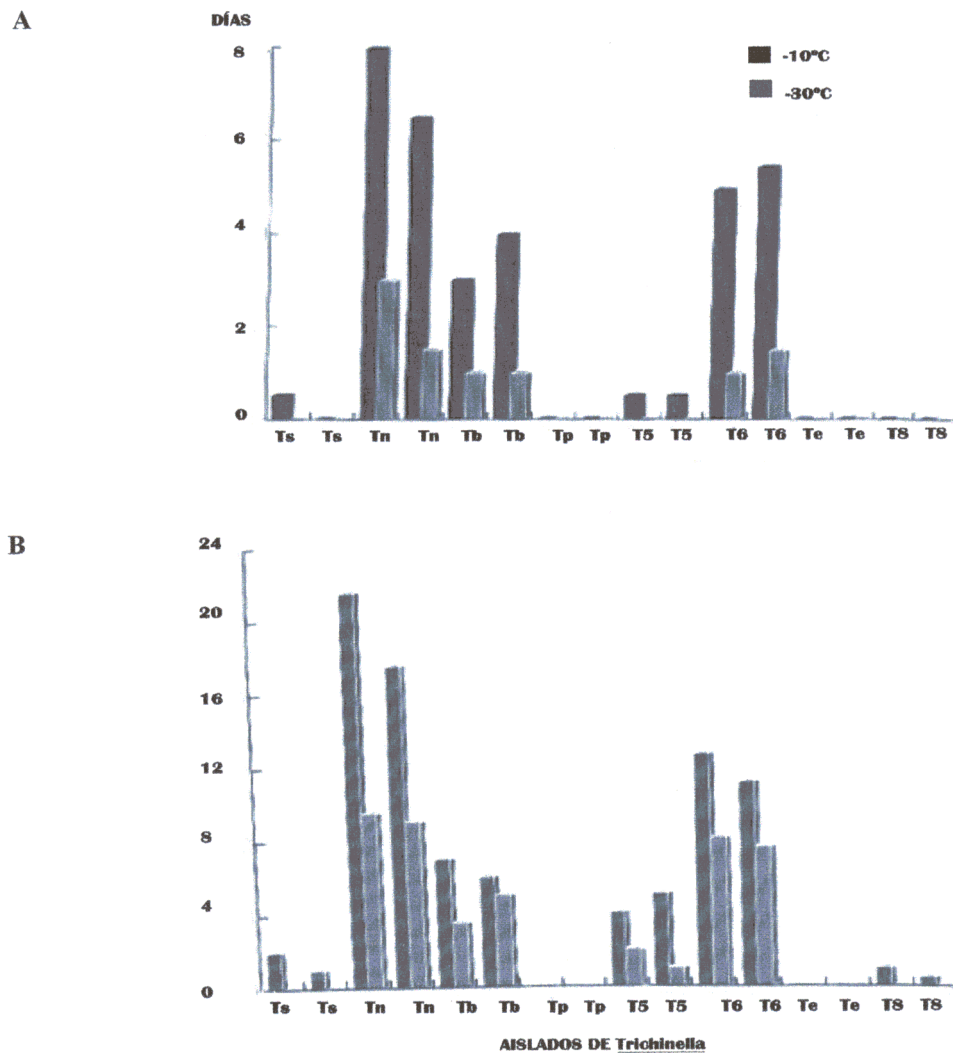


Figura 11. Infestabilidad de distintos aislados de *Trichinella* tras la congelación a -10° y -30°C : Ts (*T.spiralis*); Tn (*T.nativa*); Tb (*T.britovi*); Tp (*T.pseudospiralis*); T5; T6; Te (*T.nelsoni*) y T8. A. Dos meses p.i. B. Doce meses p.i. Tomado de Pozio y col., 1994.

➤ Metodología empleada en la congelación

Smith (1984–1985) recoge que la precongelación, proceso que reproduce más fielmente lo que ocurre en la naturaleza, suponía un incremento de la resistencia de las larvas de *T.nativa* a las bajas temperaturas, aunque no ocurría lo mismo con *T.spiralis*.

Zimmermann y col., (1985) evaluaron la importancia de la posición de las muestras infestadas en el congelador, detectando que las que estaban en las posiciones superiores perdían antes su viabilidad y afirmaban que en la naturaleza sucedía algo similar y por tanto no resistirían de igual forma las larvas localizadas en el exterior que en el interior de la canal.

Pozio y col., 1994 señalan también, como factor fundamental, el tiempo y la temperatura de congelación, indicando que la temperatura de -10°C es mejor tolerada por cualquiera de las especies, que la de -30°C . Además, la temperatura a la que se realizan las distintas experiencias puede explicar, al menos en parte, los resultados tan dispares obtenidos por los diversos investigadores.

7.3.2. RESISTENCIA A LAS ALTAS TEMPERATURAS

Sokolova (1978) estudió la estabilidad frente al calor, observando que mientras *T.pseudospiralis*, *T.spiralis* y *T.nativa* permanecían infestantes durante 10, 20 y 30 minutos respectivamente, a 56°C ; *T.nelsoni* resistía 60 minutos, y a $58-59^{\circ}\text{C}$ conservaba su viabilidad durante 45 minutos. Asimismo Boev y col., (1979) determinaron que *T.nelsoni* era la más estable a altas temperaturas. Shaikenov (1983) señaló por el contrario, que *T.nelsoni* y *T.spiralis* eran las primeras en reaccionar frente al calor. Esta disparidad de resultados puede atribuirse a la confusión que se produjo entre los aislados africanos (actual *T.nelsoni* y T8) y los europeos (actual *T.britovi*). Armas Serra (1987), estudiando aislados de origen hispánico detectó que la más resistente era C-76 (*T.britovi*) que era capaz de resistir 45 minutos a 56°C .

Varios autores se han preocupado de estudiar la importancia que puede tener el tipo de muestra de la carne infestada y la técnica de calentamiento en la estabilidad de las larvas frente a las altas temperaturas.

Modic & Djodjervic (1980 y 1981) encontraron que una temperatura de 65°-70°C durante 5 minutos, aplicada al centro geométrico de un trozo de carne infestada, provocaba la muerte de todas las larvas ; mientras que en condiciones similares, el calor no afectaba a las larvas contenidas en derivados cárnicos (salchichas o hamburguesas). Kotula y col., (1983) apreciaron la importancia que tiene también la técnica de calentamiento, ya que cuando utilizaban un horno convencional a 70°C o un grill, todas las larvas morían inmediatamente ; mientras que con un microondas no ocurría lo mismo, lo que atribuían a que el microondas no calentaba uniformemente la muestra de carne.

7.4. RESISTENCIA A ANTIHELMÍNTICOS

Desde que Ozeretskowskaya (1970, citado por Eaton, 1979) determinó que la actividad de thiabendazol sobre la fase muscular de las triquinelas sinántropicas era inferior a la presentada por los aislados árticos, han sido relativamente pocos los autores que se han dedicado a examinar esta cualidad como posible característica diferencial entre poblaciones y la mayoría de ellos han comparado la actividad de diversos compuestos sobre *T.spiralis* y *T.pseudospiralis*, solamente. (Spaldanova y col., 1978 ; Abia-Vega y col., 1982 ; Chadee y col., 1983 ; Boczon y col., 1984 ; Gomez-Barrio y col., 1986a y b). Y a pesar de haber sido reclamado como un posible criterio de caracterización de aislados por Dick (1983a), ha proporcionado pobres resultados cuando se empleado en este sentido (Armas-Serra, 1987).

7.5. CRITERIOS GENÉTICOS

Los primeros estudios fueron las pruebas de entrecruzamiento y el número de cromosomas, pero en años más recientes se han desarrollado nuevas técnicas basadas, bien en el estudio de isoenzimas, o en de ADN como PCR, RAPD, polimorfismo de los fragmentos de restricción enzimática, etc.

7.5.1. PRUEBAS DE ENTRECRUZAMIENTO

La capacidad de hibridación o entrecruzamiento, entre dos poblaciones con descendencia viable, ha sido uno de los criterios fundamentales para la consideración de éstas como especies o subespecies. Este tipo de pruebas han generado grandes controversias debido a las numerosas diferencias que se producen entre unos trabajos y otros, atribuidas a la metodología o a los aislados empleados. El problema de las pruebas de entrecruzamiento es la incertidumbre de si un resultado negativo es indicativo del fenómeno de aislamiento reproductivo, cuando se emplea el método de pares simples, y de si estaría libre de errores en el caso de los pares múltiples. Por ello, ciertos autores consideran a estas pruebas como no válidas para el estudio del flujo genético entre especies (La Rosa y col., 1991), mientras que otros consideran que la hibridación entre individuos es un medio para conocer la compatibilidad biológica y la naturaleza de las relaciones entre dos grupos (Cabaret & Duret-Desset, 1991), siendo a su vez indicativa del flujo genético en potencia que podría existir entre poblaciones en contacto (Lichtenfels y col., 1994). Por otro lado, según señalan otros autores como Zarlenga (1994), la obtención de híbridos en condiciones experimentales no va a garantizar su existencia en la naturaleza, si bien demuestra que, en condiciones óptimas, el flujo genético entre especies de *Trichinella* podría ser posible.

7.5.2. PRUEBAS DE ADN**7.5.2.1. ADN REPETITIVO Y ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN**

Las enzimas de restricción, han permitido estudiar el genoma, sea expresado éste fenotípicamente o no. Los fragmentos de ADN producidos por estas enzimas son susceptibles de estudio por medio de técnicas electroforéticas y de hibridación, con un patrón característico apto para ser utilizado como criterio de caracterización de los aislamientos de *Trichinella*. Se sabe que aproximadamente el 42% del ADN genómico de *Trichinella* esta constituido por secuencias repetitivas. Como las secuencias intergénicas repetitivas generalmente conllevan cambios evolutivos rápidos, es probable por tanto, que sean regiones de variabilidad secuencial tanto a nivel de especies como de subespecies (Zarlenga y col., 1991). Por ello esta técnica ha sido empleada por diversos autores para la caracterización de aislados: Curran y col., 1985; Dick y col., 1985 y 1990; Klassen y col., 1986a; Chambers y col., 1986; Dame y col., 1987; Minchella y col., 1989; Manriculic y col., 1991b; Zarlenga y col., 1991 y An, 1994.

7.5.2.2. SONDAS ESPECÍFICAS

Las técnicas de hibridación se basan en el apareamiento del ácido nucleico a estudiar con otra molécula de ADN o ARN conocida, denominada sonda. Para la obtención de sondas específicas se parte normalmente de secuencias altamente repetitivas presentes en el genoma, en este caso del parásito. Estas regiones no suelen ser codificadoras, por lo que están sometidas a rápidos cambios evolutivos, con lo que la probabilidad de homología con secuencias de otros organismos es baja y se las puede considerar como regiones especie o género específicas (Zarlenga, 1994b). Las

siguientes sondas han sido empleadas en la caracterización de aislados y especies de *Trichinella* :

- Sonda lambda TsR1 obtenida por Chambers y col., (1986), a partir de ADN genómico de *T. spiralis*. Hibrida con *T. spiralis*, *T. nativa* y *T. nelsoni*, pero no con *T. pseudospiralis*. Esta misma sonda fue empleada por Gárate y col (1991), en una serie de aislados hispanos, detectando dos poblaciones distintas de *Trichinella* en España, siendo GM-1 y C-76 los prototipos de cada una de ellas.
- Sonda específica de *T.spiralis* pPra (Klassen y col., 1986b; Dick y col., 1990).
- Sonda específica de *T.spiralis* pB2 (Dame y col., 1987; Minchella y col., 1989 y Marinulic y col., 1991).
- Sonda específica de *T.spiralis* pBP2 (Snyder y col., 1993 y Zarlenga, 1994).
- Sonda pUPB-3.7, específica de T5 (Zarlenga y col., 1991 y Snyder y col., 1993).
- Sonda pPB1.21, específica de *T.nativa* (Zarlenga, 1994).
- Sonda pT1.6, específica de *T. spiralis* (La Rosa y col., 1994).
- Sonda pT2.13, específica de *T. nativa* (La Rosa y col., 1994).
- Sonda pT3.4, específica de *T.britovi* (La Rosa y col., 1994).
- Sonda pT7.3, específica de *Tnelsoni* (La Rosa y col., 1994).
- Sonda pT8.3, específica de T8 (La Rosa y col., 1994).
- Sonda pTs5.32, para *T.pseudospiralis* (Lindsay, 1995).

7.5.2.3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La técnica de PCR (Mullis y col., 1986) es un método alternativo al empleo de sondas para detectar secuencias específicas (Wilson, 1991), ya que permite la amplificación exponencial de fragmentos de ADN, elegidos o no al azar, partiendo de pequeñas cantidades del material a estudiar.

Utilizando los cebadores contruidos a partir del fragmento de 1,6 Kb de la sonda pPra de *T.spiralis*, (de Vos y col., 1988), algunos autores han amplificado ADN de *Trichinella*; cebadores que parecen ser específicos para *T.spiralis*, ya que no había amplificación para *T.nativa* (Dupouy-Camet y col., 1991), *T.pseudospiralis*, ni para otros aislamientos silvestres (Dick y col., 1992). Por otro lado, Soulé y col., (1993), usando este mismo cebador, no consiguieron amplificar ADN ni de *T.pseudospiralis*, *T.nativa* ni *T.britovi*, si bien obtuvieron patrones de amplificación, aunque distintos, para *T.spiralis* y *T.nelsoni*, sugiriendo por tanto, que dicho fragmento no era específico para *T.spiralis*. Estos mismos cebadores han sido empleados por Soulé y col., (1994), para detectar larvas migratorias de esta última especie en sangre de caballo.

7.5.2.4. AMPLIFICACIÓN AL AZAR DE ADN POLIMÓRFICO (RAPD-RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA)

Williams y col., en 1990, describieron un protocolo de amplificación basado en el uso de un único cebador de 10 nucleótidos de secuencia arbitraria, esta variante de la PCR convencional no requiere un conocimiento previo de la secuencia de ADN y utiliza una temperatura de anillamiento del

cebador a la cadena molde de ADN más baja. Esta técnica se ha aplicado en el caso de *Trichinella* para intentar definir la estructura taxonómica del género y como técnica para la caracterización de aislamientos. Así Tighe y col., (1994) observan una gran semejanza en los mapas de amplificación de *T.nativa* y T6; Dupoy-Camet y col., (1994 a y b) por el contrario detectan escasas diferencias entre *T.nativa*, *T.britovi* y T5.

Bandi y col., (1993 a y b) han sido capaces de obtener, empleando cebadores de 10 bases, patrones de amplificación discriminantes entre *T.spiralis* y *T.britovi*, partiendo de una sola larva. Posteriormente Bandi y col., (1994 y 1995) consiguieron amplificar una sola larva de los 8 grupos taxonómicos de *Trichinella*, aunque empleando cebadores de 20-25 bases, y gracias a esta técnica y empleando una sola larva, Bandi y col., (1994) y Pozio y col., (1995) consiguieron detectar infestaciones mixtas de *T.nativa* y *T.britovi* en *Procyon lotor* y *Nyctereutes procyonoides*, respectivamente.

Respecto de los aislados hispanos diversos autores han confirmado, mediante esta técnica la identidad de una serie de aislados: Serrano y col., (1994); Chacón y col., (1994); Rodríguez y Gárate, (1994); Arribas y col., (1994) y Rodríguez y col., (1995 y 1996), quedando bien definida la presencia únicamente de dos de las especies, *T.spiralis* y *T.britovi*. Pozio y col., (1997a), en 91 aislados procedentes de España, detectaron tres muestras correspondientes a jabalíes que presentaban una infestación mixta por *T.spiralis* y *T.britovi*, mediante el empleo de RAPD con una sola larva. La presencia de infestaciones concurrentes en un mismo hospedador sugiere, por tanto, que el estudio de isoenzimas y ácidos nucleicos de un grupo de

larvas puede crear confusión en el proceso de identificación de las especies de *Trichinella*.

7.6 CRITERIOS BIOQUÍMICOS

7.6.1. ESTUDIOS DE ISOENZIMAS

Los perfiles enzimáticos que se obtienen en la electroforesis frecuentemente detectan la presencia de isoenzimas, que se definen como formas moleculares múltiples de una enzima dada, que aparecen en un solo individuo o en distintos miembros de una misma especie (Harris & Hopkinson, 1976). Además, la electroforesis ha llegado a ser una herramienta válida para definir relaciones sistemáticas entre nematodos, cuando los criterios morfológicos son insuficientes, probando que son aislados genéticos sustancialmente diferentes, dentro de una especie. (Mydynski & Dick, 1985).

El estudio electroforético de sistemas enzimáticos ha proporcionado datos sobre un gran número de problemas en Zoología, Genética y Parasitología, ya que según Pozio y col., (1989c) hacen posible :

- Estimar la cantidad de divergencia genética entre poblaciones.
- Analizar los patrones de variación genética en poblaciones naturales.
- Detectar especies "hermanas".
- Investigar el flujo genético.
- Investigar la hibridación natural entre poblaciones y especies.
- Analizar el rumbo genético y el fenómeno de la selección natural

Diversos autores, mediante el empleo de esta técnica, confirmaron la variabilidad intraespecífica que previamente se había puesto de manifiesto por otros medios, como Flockhart y col., (1982) quienes consiguieron

diferenciar *T.spiralis* de *T.nativa* y de *T.nelsoni*; Mydyski & Dick (1985) diferenciaron 3 formas principales de *Trichinella*: aislados procedentes de cerdo, aislados procedentes de carnívoros salvajes y *T.pseudospiralis*; subrayando que existía una mayor similitud entre los perfiles isoenzimáticos de *T.pseudospiralis* y los de carnívoros salvajes, que entre los perfiles del primero con los aislados procedentes de cerdo. Fukumoto y col., (1988), combinando esta técnica con el isoelectroenfoco conseguía una mejor resolución y, en base a sus resultados, construyeron un árbol filogenético, en el que diferenciaban claramente *T.pseudospiralis*, designándola como Tipo 1, del resto de los aislados de naturaleza quística, englobados dentro del grupo Tipo 2.

Sin embargo, fueron los trabajos del grupo de Pozio los que pusieron de manifiesto la existencia de cuatro especies bien definidas, actualmente ampliadas a cinco y a tres grupos de clasificación taxonómica incierta.

En 1987 parten de 23 aislados para su tipificación por isoenzimas, discriminando entre las especies ya mencionadas *T.pseudospiralis*, *T.nativa*, *T.nelsoni* y *T.spiralis*, bastando para ello un único sistema enzimático bien EM (enzima málica) o G6PDH (glucosa 6 fosfato deshidrogenasa). Posteriormente estos mismos autores (Pozio y col, 1989b y La Rosa, 1989) reconocen:

➤ Los autores rusos que habían defendido la existencia de varias especies, habían analizado un número elevado de aislados y de orígenes muy diversos, pero las técnicas de análisis eran inadecuadas (parámetros biológicos y pruebas de entrecruzamiento).

➤ Los autores americanos reconocían una sola especie que a su vez comprendía cuatro subespecies. Para ello, habían empleado técnicas más sofisticadas de ADN e isoenzimas, pero el número de aislados analizados era muy reducido.

Por lo tanto, en este trabajo se plantea un nuevo análisis, pero sobre un número más elevado de aislados, (120) y de procedencia geográfica muy diversas (Europa, Asia, Africa, Nueva Zelanda y USA). Así, utilizando 25 sistemas enzimáticos detectaron la presencia de siete cluster electroforéticos diferenciados, cuatro de los cuales fueron identificadas como las especies descritas por los autores rusos, y tres grupos sin categoría taxonómica concreta : *T.spiralis sensu stricto*; *T.nativa*, T3, *T.pseudospiralis*, T5, T6 y *T.nelsoni*. Los nuevos grupos se distribuían geográficamente al sur de la región Paleártica (T3) y en EE.UU. (T5 y T6). Asimismo, este estudio permitió distinguir entre *T.nelsoni* de la región Palearctica (que pasaba a ser T3) y las de origen africano, actuales *T.nelsoni* o T7, que no podían diferenciarse mediante pruebas de entrecruzamiento.

En 1991, La Rosa y col., (1991a) llevaron a cabo el análisis isoenzimático de dos aislados *T.nelsoni* africanos ecuatoriales (procedentes de Kenia y de Tanzania) y 47 aislados *T.nelsoni* de Europa, observando una gran heterogeneidad dentro de este grupo, de forma que se podía discriminar perfectamente entre los aislados africanos y los europeos y proponía designarlos como T7 y T3 respectivamente; distinguiendo además 5 subgrupos dentro de este último (T3a–T3e).

Ese mismo año, Pozio, La Rosa & Verster, utilizando 27 sistemas enzimáticos, analizaron además de los dos aislados de Africa ecuatorial mencionados anteriormente, otros dos aislados procedentes de Sudáfrica, con el fin de determinar las relaciones genéticas existentes entre ellos y compararlas con los aislados de referencia T1 y T3. Los resultados mostraban nuevamente una gran heterogeneidad dentro del grupo, de forma que los aislados sudafricanos estaban más próximos a los aislados paleárticos, que a los aislados ecuatoriales. Similitud genética que podría explicar porque los autores soviéticos definieron a los aislados de Sudáfrica y a los Paleárticos como *T.nelsoni* (Britov & Boev, 1972; Shaikenov & Boev, 1983), incluyendo en esta misma confusión a los aislados ecuatoriales, cuyas características biológicas tan distintas fueran asumidas por los autores rusos, englobándolos dentro de la misma especie. Por tanto concluían que la, hasta entonces especie *T. nelsoni*, incluiría 3 grupos genéticos distintos:

- T3 en Europa y Asia
- T7 en Africa Ecuatorial
- T8 en Sudáfrica

Dada la complejidad de los resultados obtenidos hasta ese momento La Rosa y col., (1992) llevaron a cabo un nuevo análisis con 27 sistemas enzimáticos sobre 152 aislados procedentes de distintas y numerosas regiones y de diferentes hospedadores, demostrando finalmente que el género *Trichinella* es altamente heterogéneo y se compone, al menos, de 8 grupos genéticos distintos, 4 identificables con las especies definidas por Britov & Boev (1972) , y otros cuatro de nueva creación (T3, T5, T6 y T8). Además dentro de alguno de los grupos definidos se podían distinguir subgrupos:

- T1 (a-c) : con glucosa fosfato isomerasa (GPI) y glucosa 6 fosfato (G6PD)
- T2 (a-h) : con glutamato deshidrogenasa (GLDH), lenzima málica (EM) y la manosa fosfato isomerasa (MPI)
- T3 (a-e) : con enzima málica (ME), manosa fosfato isomerasa (MPI) y fosfoglucomutasa (PGM).

Finalmente ese mismo año, tras el análisis de datos genéticos y bioquímicos, diferencian como nueva especie al grupo T3, pasando a denominarla como *T.britovi*.

Otros trabajos ayudaron a completar la actual visión que se tiene de la taxonomía de *Trichinella* : La Rosa y col., (1990), en aislados procedentes de Groenlandia detectan la presencia de T2; Pozio y col., (1992c) sobre *T.pseudospiralis* ; La Rosa y col., (1991b) comprueban la presencia de T1 y T3 en zorros de Francia ; Snyder y col., (1993) combina estas pruebas con el uso de sondas para ADN y confirma la presencia de T5 en la fauna salvaje de Illinois y Pozio y col., (1996), amplian los estudios a muestras procedentes de Japón donde detectan *T.nativa* y *T.britovi*.

7.6.2. ESTUDIO DE PROTEÍNAS

Aunque la mayoría de los estudios se han realizado usando técnicas isoenzimáticas, varios autores también han investigado la composición protéica desde otros puntos de vista, procediendo la mayoría de los datos del análisis de extractos parciales del parásito más que del homogenado total.

Almond y col., (1986), estudiaron los componentes protéicos de superficie, marcados con 125 I por el método de la cloramina T, y los productos de ES marcados con 35 S-metionina, de embriones, larvas y adultos de *T.pseudospiralis* y *T.spiralis*. Los resultados mostraban que los dos tipos de proteínas marcadas permitían diferenciar tanto adultos como larvas de ambos aislados.

La separación electroforética por SDS-PAGE de los productos de ES, de las proteínas de superficie o de la fracción S3 también ha sido utilizada por diversos autores Gamble & Murrell (1986); Bolás Fernández & Wakelin (1989); Komandarev y col. (1986). Y dada la complejidad de los patrones electroforéticos, ha sido combinada con el isoelectroenfoco por otros autores para mejorar la resolución (Garate & Rivas, 1987; Illescas y col. 1992).

Estos estudios bioquímicos han revelado diferencias sustanciales entre distintos aislados de *Trichinella*; diferencias que no solo tienen interés como medida de la variabilidad, sino también porque muchas de estas moléculas pueden ser reconocidas como antígenos por el sistema inmune del hospedador. Cuya descripción ha sido recogida en apartados anteriores.

7.6.3. ESTUDIO DE PROTEASAS

Los helmintos parásitos modulan la respuesta inmune por la producción de muchas clases de proteínas con diversas actividades biológicas. Uno de los grupos principales incluye las proteasas producidas por muchas especies de nematodos (Sakanari, 1990, citado por Takamoto & Sugane, 1993). Las proteasas son enzimas capaces de catalizar la hidrólisis de enlaces peptídicos. Entre las funciones que se han descrito están : facilitar la

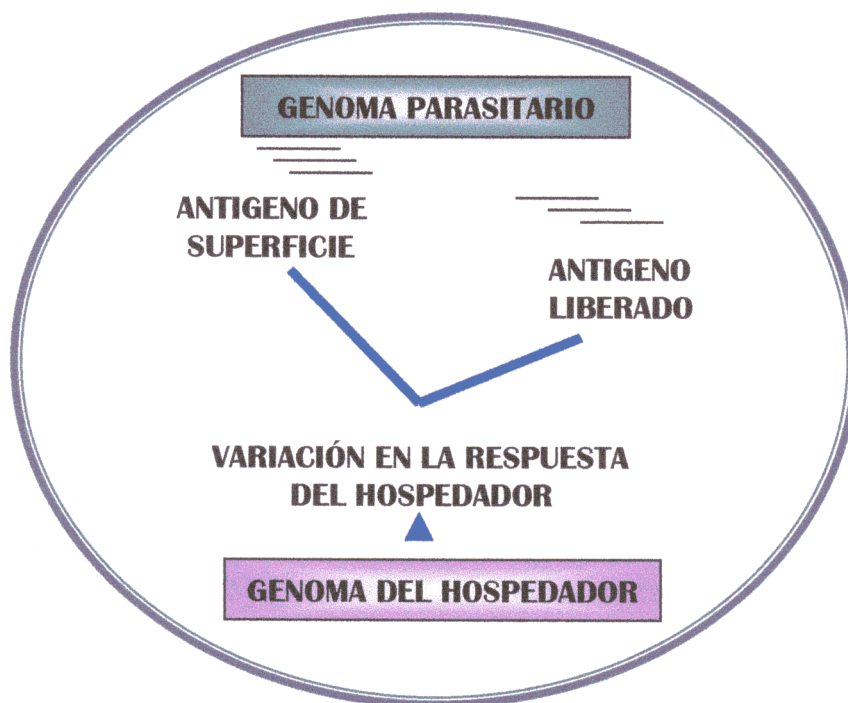
invasión de los tejidos del hospedador, participar en la digestión de las proteínas del hospedador, ayudan a evadir la respuesta inmune y previenen la coagulación sanguínea. Parecen por tanto, jugar papeles críticos en la patogénesis de las enfermedades parasitarias (McKerrow, 1989).

Se ha estudiado la presencia de proteasas en *Trichinella spiralis*, tanto en el extracto crudo como en los productos de ES, en recientes trabajos. Así en los productos de ES, Takamoto & Sugane (1993), señalan la existencia de varias serin-proteasas y Criado-Fornelio y col., (1992) de tres proteasas de 33,62 y 230 kDa. Estos mismos autores detectan tres proteasas de 48,54 y 62 kDa en el extracto bruto y Niimura y col., (1988) encuentran una proteasa de 160 kDa en el extracto bruto de *T.spiralis*. Armas-Serra y col., (1995b) ha purificado del ES una proteína de 35kDa como posible serin-proeasa que sería diana de la respuesta inmune en la infestación por *T.spiralis*, de forma que incluso *in vitro* se bloquearía el sitio activo de la enzima cuando se enfrenta a sueros de animales infestados por dicho parásito (Armas-Serra y col., 1995a). Recientemente se ha descrito también actividad proteolítica en los extractos brutos de 4 aislados de *Trichinella*, (C-76, Garkavi, GM-1 y Noruega), observándose que la máxima actividad aparece a pH ácido, sobre un sustrato de azocoll en todos los aislados. Siendo además importante la actividad a pH neutro en el caso de GM-1 y Noruega, mientras que no es apreciable en el caso de las otras dos. En todos los extractos se detecta actividad de los cuatro tipos de proteasas descritas (aspartil, cistein, serin y metaloproteasas) excepto en el caso de C-76, que parece presentar solo actividad aspártico proteasa, al emplear azocoll como sustrato. (Gimenez-Pardo y col., 1995)

7.7. CRITERIOS INMUNOLÓGICOS

La infestabilidad y la patogenicidad son parámetros que están determinados por las interacciones específicas entre aislados y hospedadores. Ambos son reflejo de unos particulares niveles de inmunidad e inflamación generados a consecuencia de la infestación, los cuales a su vez son producto de la capacidad genética de respuesta del propio hospedador y de la inmunogenicidad determinada genéticamente por el aislado. (Wakelin & Goyal, 1996).

INMUNOGENICIDAD PARASITARIA



INMUNOGENETICA DEL HOSPEDADOR

Figura 12. La forma en la que las variaciones en la inmunogenicidad del parásito y la respuesta inmune del hospedador interactúan para determinar el balance de la interacción parásito-hospedador. Las líneas indican los puntos de interacción entre parásito y hospedador. Tomado de Wakelin, 1993.

7.7.1. VARIABILIDAD ANTIGÉNICA EN LAS ESPECIES DE *TRICHINELLA*

Como se ha comentado previamente, numerosos estudios bioquímicos han revelado la presencia de diferencias entre los aislados de *Trichinella*, diferencias que han resultado fundamentales como medida directa de la variabilidad, pero también porque muchas de las moléculas estudiadas, al ser reconocidas como antígenos por el sistema inmune del hospedador, podrán influir en las variaciones observadas en la infestación, y que al menos en potencia, estarían mediadas por la respuesta inmune. (Wakelin & Goyal, 1996).

Sukhdeo & Meerovitch (1979) analizaron la composición antigénica del extracto bruto larvario de tres aislados con diferente origen geográfico (Alaska, Canada y Kenia). Para ello emplearon inmunoelectroforesis cruzada bidimensional, demostrando la presencia de 27–28 componentes capaces de inducir la producción de anticuerpos, tras la inmunización de conejos. Los diferentes aislados no presentaban el mismo número de componentes antigénicos en los sistemas homólogos de antisuero–antígeno, así los aislados Alaska y Canadá presentaban 27 componentes mientras que en el aislado tropical, eran 28 los componentes. Por otro lado, en los sistemas heterólogos obtenían menos arcos de precipitación; de forma que las combinaciones heterólogas entre los aislados Alaska y Canadá indicaban que compartían 19–20 antígenos, mientras que entre Alaska y Kenia eran 21 los antígenos compartidos, y por último Kenia y Canadá compartían 24–25. Por tanto, el aislado Alaska difiere de los otros dos en 6–7 antígenos, mientras que el tropical y el canadiense difieren entre sí, en solo 3 antígenos, por lo que habría más similitudes antigénicas entre estos dos últimos. A pesar de las diferencias encontradas consideran que el uso de los análisis serológicos,

como criterio taxonómico, debería usarse en conjunción con otras pruebas estandard.

Almond y col., (1986) estudian las diferencias entre las proteínas de superficie y de la cutícula de *T.pseudospiralis* y *T.spiralis*. Observan por medio de estudios de radio-marcaje con ^{125}I , que las proteínas de superficie obtenidas para cada estado del parásito, en electroforesis, son estado-específicas. Al comparar cada estado de ambas especies observan que el perfil es bastante similar, e incluso indistinguible, en el caso de los embriones. En los adultos, en condiciones reductoras, aparecen bandas a 40, 33 y 20 kDa, pero mientras que en *T.spiralis* todas son de la misma intensidad, en *T.pseudospiralis* la de 40 kDa es la predominante y la de 33, la menos intensa. Asimismo, comparan las movilidades electroforéticas de las proteínas radiomarcadas de las larvas L1 por SDS-PAGE con las de *T.nativa* y *T.nelsoni*, viendo que *T.nativa* era indistinguible de *T.spiralis* y que *T.nelsoni* era más próxima a *T.pseudospiralis*. En el caso de las proteínas de ES también, en ambas especies, son estado-específicas y al igual que en el caso de las proteínas de la cutícula, las de los embriones son indistinguibles, mientras que las de L1 y adultos, presentan unas bandas compartidas y otras únicas. Por tanto concluyen que, a pesar de la proximidad entre ambas especies, éstas pueden distinguirse por metodos bioquímicos.

Diversos estudios intentaron correlacionar directamente la variación antigénica entre aislados procedentes de distintas áreas geográficas con diferencias en la infestabilidad. Bolás & Wakelin (1989, 1990), compararon las proteínas de superficie extraídas con el detergente CTAB y el extracto crudo larvario marcado con ^{125}I o directamente sin marcar, en SDS-PAGE y

Coomasie. Los perfiles de los extractos crudos larvarios eran bastante semejantes al compararse por esta última técnica, sin embargo había ciertas diferencias en los aislados *T.pseudospiralis* y *T.spiralis* var *nativa*. La primera presentaba una marcada banda de 27 kDa, que no aparecía en los otros aislados. En el caso de *T.spiralis* var *nativa* (W), aparecían varias bandas más intensas entre 30 y 67 kDa. Sin embargo, las diferencias más apreciables se detectaban al analizar las proteínas de superficie, tanto cuali- como cuantitativamente, siendo lo más importante, la existencia de una banda de 14 kDa, solo en el aislado Y (*T.spiralis* procedente de Nueva Zelanda).

En un estudio similar, pero empleando 5 aislados de origen español (GM-1, C-76, Laso, Mad-83 y Sevilla) y uno de origen británico (London) como aislado de referencia, Bolás & Wakelin (1992), compararon mediante electroforesis en geles SDS-PAGE, los antígenos de superficie extraídos con CTAB. El aislado London mostraba tres bandas principales entre 43-50 kDa, una banda a 67 kDa y una banda ligera a 62 kDa, mientras que el resto de los aislados mostraban las bandas de 43-50 kDa, Mad-83 solo mostraba la banda a 67 kDa y ninguna la de 62. C-76 presentaba un patrón diferente, con dobletes a 50 y 43 kDa y una banda adicional a 20 kDa.

En este mismo sentido, Goyal & Wakelin (1993) comparan tres aislados que se habían caracterizado como T1 denominados L, S, y P y, aunque no encontraban diferencias en los perfiles protéicos de las preparaciones de los antígenos somáticos, sí que apreciaban diferencias en los patrones de reconocimiento cuando se enfrentaban con los antisueros homólogos y heterólogos, obtenidos de ratones infestados con cada uno de los aislados.

Los western-blots con los sueros homólogos proporcionaban importantes diferencias entre aislados, así los sueros de ratones infestados con los aislados L y P presentaban varias bandas intensas a 20 kDa ; además el aislado P presentaba una banda a 43 kDa.

En todos ellos encuentran evidentes similitudes en los antígenos principales (Bolás & Wakelin, 1990), lo que queda patente por la expulsión acelerada de las infestaciones heterólogas, como probable reflejo de respuestas específicas frente a antígenos compartidos ; sin embargo, la posible existencia de variaciones en los antígenos fundamentales para el desarrollo de la respuesta inmunológica e inflamatoria, a través de la cual se expresa la resistencia, podrían explicar en parte la variación en la infestabilidad de los distintos aislados (Bolás & Wakelin, 1992).

Esta variabilidad antigénica también es fundamental a la hora de seleccionar antígenos para el desarrollo de pruebas diagnósticas. En este sentido, Gamble & Murrell (1986) llevaron a cabo un estudio para comprobar la validez del método ELISA utilizando antígenos de ES, y dos proteínas aisladas por medio de cromatografía de afinidad, una de 49 y otra de 59 kDa, para el diagnóstico de distintos aislados de *Trichinella*. Utilizan para ello los aislados *T.spiralis* (cerdo), *T.nativa* (oso polar) y *T.pseudospiralis*. Cuando probaron 25 sueros en ELISA, tanto con los productos de ES de cada uno de los aislados como con las proteínas aisladas Ts49 y Ts53, en todos los casos fueron positivos, aunque los aislados con baja infestabilidad tenían también bajos valores en ELISA. Posteriormente, al comparar los productos de ES de los tres aislados, por SDS-PAGE, detectaron una proteína de 92 kDa en

T.nativa, ausente en *T.spiralis* y más débilmente patente en *T.pseudospiralis*, faltando además en esta última, la proteína de 49 kDa.

Estas diferencias antigénicas cualitativas o cuantitativas, demostradas entre las distintas especies de *Trichinella* pueden constituir la base para el desarrollo de sistemas que permitan la identificación del agente etiológico en la triquinosis humana. (Tamburrini y col., 1996)

7.7.2. RESPUESTA INMUNE

De las especies de *Trichinella* descritas, es *T.pseudospiralis* la que presenta unas diferencias más evidentes ; no solo en cuanto al tamaño o la preferencia por el hospedador, sino porque la larva muscular no está rodeada de la cápsula de colágeno, presente en el resto de especies, como estructura protectora, quedando por ello más expuesta al reconocimiento por el sistema inmune. Diversos estudios han demostrado que las respuestas celulares tanto en la fase enteral como parenteral son marcadamente menores en las infestaciones por *T.pseudospiralis* que en las causadas por *T.spiralis* y, en consecuencia, la inflamación en el intestino, músculo estriado y cardíaco está suprimida. (Przyjalkowski y col., 1983 ; Stewart y col., 1985) ; por lo que Stewart y col., (1988) y Stewart y col., (1991) propusieron que la capacidad de las larvas de *T.pseudospiralis* para escapar a la destrucción por el sistema inmune, está íntimamente unida a una depresión generalizada de las respuestas inflamatorias del hospedador. Además, mediante estudios de adrenalectomía se sugirió que esta supresión está mediada, en parte, a través de la modulación de la función adrenal del propio hospedador (Stewart y col., 1988). Existe

además una segunda estrategia de evasión del sistema inmune que consiste en la expresión del denominado asialo GM1, un glucolípido presente en una gran variedad de células de origen hematopoyético, y que sirve de camuflaje para las larvas de *T.pseudospiralis* y de *T.spiralis*, antes de formar la cápsula. Esta molécula no va a estar presente en los gusanos hasta su llegada al músculo, de forma que *in vivo* no se detectan anticuerpos anti-asialo GM1, ya que el desarrollo de estos anticuerpos conllevaría un choque anafiláctico y en consecuencia, la muerte del hospedador. (Niederkorn y col., 1988).

La infestación de ratones con *T.pseudospiralis* se caracteriza por una fuerte respuesta de neutrófilos en sangre y cavidad peritoneal (Przyjalkowski y col., 1981, 1983), sin embargo, parece que el parásito es capaz de elaborar una molécula que suprime la respuesta quimiotáctica de los neutrófilos, con lo que se impediría el flujo de éstos hacia la musculatura, donde está ya establecido, contribuyendo, no solo a la reducción de la miositis, sino también a la prevención de la destrucción del parásito. (Stewart, 1989 ; Shupe & Stewart, 1991).

Las comparaciones de la infestación con un solo aislado en una serie de razas de ratones consanguíneas, permite establecer la extensión con la que el hospedador influye en la infestabilidad y patogenicidad. Por otro lado, las comparaciones de varios aislados en una sola raza de ratones consanguíneas puede utilizarse para definir variaciones en la inmunogenicidad. Por tanto estas comparaciones van a ayudar, no solo a clarificar puntos de interés taxonómico, sino también a proporcionar un

método válido para investigar la expresión y regulación de la respuesta del hospedador frente a la infestación parasitaria. (Wakelin & Goyal, 1996).

En este sentido se han llevado a cabo diversos estudios, así Dick y col., (1988) basándose en los efectos de la inmunidad sobre la expulsión de los adultos del intestino y la reducción de la fecundidad, analizan estos parámetros en una serie de cepas de ratones consanguíneas, unas de alta y otras de baja respuesta frente a la infestación por tres aislados, de los cuales uno es *T.pseudospiralis* (TP), y los otros, un aislado de cerdo (P1) y otro de zorro ártico (AF1), son triquinelas quísticas. Observaron que las cepas de ratones de respuesta alta, habían expulsado un 80% de los adultos a día 10 p.i., en el caso de los aislados P1 y AF1, existiendo además una disminución del número de embriones puestos a este mismo día por los controles, en relación al día 6 p.i.. Señalan además, que la respuesta frente al aislado AF1 fue más rápida en comparación con los otros aislados, incluso en el caso de los respondedores lentos. En el caso de TP los efectos sobre fecundidad y expulsión fueron menores incluso en las cepas de alta respuesta. Wassom y col., (1988) realizan un estudio paralelo con sólo dos cepas de ratones, una de alta y otra de baja respuesta, frente a la infestación y posterior reinfestación con los mismos aislados empleados en el estudio anterior. Detectan que en las reinfestaciones homólogas la expulsión se realizaba más rápidamente, coincidiendo con una mayor tasa de linfoproliferación en las células de ganglio linfático mesentérico. Ambos trabajos proponen que las diferencias experimentales observadas en la infestación pueden ser debidas, al menos en parte, a la diferente expresión de antígenos funcionalmente relevantes.

Bolás & Wakelin (1989), comparten la hipótesis propuesta por los anteriores autores, tras los resultados obtenidos al comparar cinco aislados de distinto origen geográfico y diferentes hospedadores en cuanto al desarrollo, supervivencia y reproducción, en dos cepas de ratones consanguíneos, de baja (C57BL/10) y alta respuesta (NIH). Uno de los aislados definido como *T.nativa* (Is-5(W)) presentaba una reducida infestabilidad respecto de los otros, con una menor supervivencia y fecundidad de los adultos en la cepa NIH. Sin embargo, estos parámetros eran más elevados en los C57 BL/10, aunque seguían siendo inferiores a los valores encontrados para la cepa Is-1(S). Cuando inmunosuprimían a los ratones NIH, la fecundidad del primer aislado aumentaba aunque no tanto, como para igualar a la cepa Is-5(W), lo que implica una diferencia real entre ambos aislados independiente de la respuesta propia del hospedador. Señalaban además, que la baja infestabilidad del aislado Is-5(W) era debida a que inducía una rápida y fuerte respuesta inmune celular, que se traducía en una disminución en la fecundidad y la supervivencia intestinal y que el alto grado de infestabilidad del aislado Is-1 (S) era debido a su capacidad para suprimir la inmunidad del hospedador. Esta hipótesis sin embargo, no coincidía con los resultados obtenidos en la medida de la respuesta humoral, ya que en este último aislado se detectaban niveles de anticuerpos equivalentes al resto de los aislados y en el caso de la cepa NIH, muy por encima de los obtenidos por el aislado menos infestante, Is-5(W).

Estos mismos autores (Bolas & Wakelin, 1990) ampliaron el trabajo anterior, analizando por Western-blot los antígenos de superficie de los mismos aislados, además de uno de *T.pseudospiralis*, empleando para ello los sueros policlonales de ratones que habían sido infestados con los aislados

W (*T.nativa*) y S (GM-1, *T.spiralis*) y un monoclonal preparado frente al aislado L (London, *T.spiralis*). En general, los patrones observados para las cepas quísticas eran similares, lo que implica la conservación entre especies de los epítomos dominantes, tal y como habían señalado Gamble & Murrell (1986). Lo más destacado sin embargo era la ausencia de la banda de 64 kDa en el aislado W, presente en el resto de los aislados. Sin embargo, el suero de los animales infestados con el aislado W (*T.nativa*), sí era capaz de reconocer esta banda en los aislados S y L, lo que sugiere que el epitopo estaría presente en el W pero sobre una proteína distinta. El patrón de reconocimiento con el anticuerpo monoclonal era más restringido, apareciendo bandas de reconocimiento entre 40 y 64 kDa, siendo las diferencias más evidentes las del aislado W (*T.nativa*), en el que no se detectaba esta última banda, y en *T.pseudospiralis* que presentaba al menos un epitopo no compartido por el resto de aislados.

En esta misma línea Goyal & Wakelin (1993a) miden la variación en la inmunogenicidad de tres aislados (S, L y P) por medio de la recuperación de adultos, mastocitosis, eosinofilia y niveles de anticuerpos en ratones NIH y C57BL/10. Observan que los niveles de protección, inflamación e inmunidad inducida por la infestación en ambas cepas variaba entre los tres aislados, y aunque estas diferencias eran más marcadas en la cepa de baja respuesta C57BL/10, estarían claramente inducidas por el aislado. Los tres aislados mostraban una diferente capacidad para inducir mastocitosis, así en los NIH y a día 12 p.i. era mayor en el aislado S, intermedio en el P y bajo en el L, sin embargo en cada caso guardaban una notable correlación con el pico de eosinofilia y los niveles de IgE, lo que indicaba alguna propiedad común de los aislados para promover este tipo de respuestas

inflamatorias. La variación más importante, se apreciaba en la capacidad de producir eosinofilia, alcanzando un brusco ascenso a partir de la segunda semana p.i., con un pico máximo entre los día 20 y 24, siendo el aislado S el que promovía los valores más altos. Por otro lado, los niveles de inmunoglobulinas totales y de IgG e IgM específicas eran mayores en la cepa de baja respuesta. Cada aislado induce niveles específicos para las inmunoglobulinas totales e isotipos, que parecen ser independientes de la carga parasitaria, implicando la existencia de una diferente inmunogenicidad.

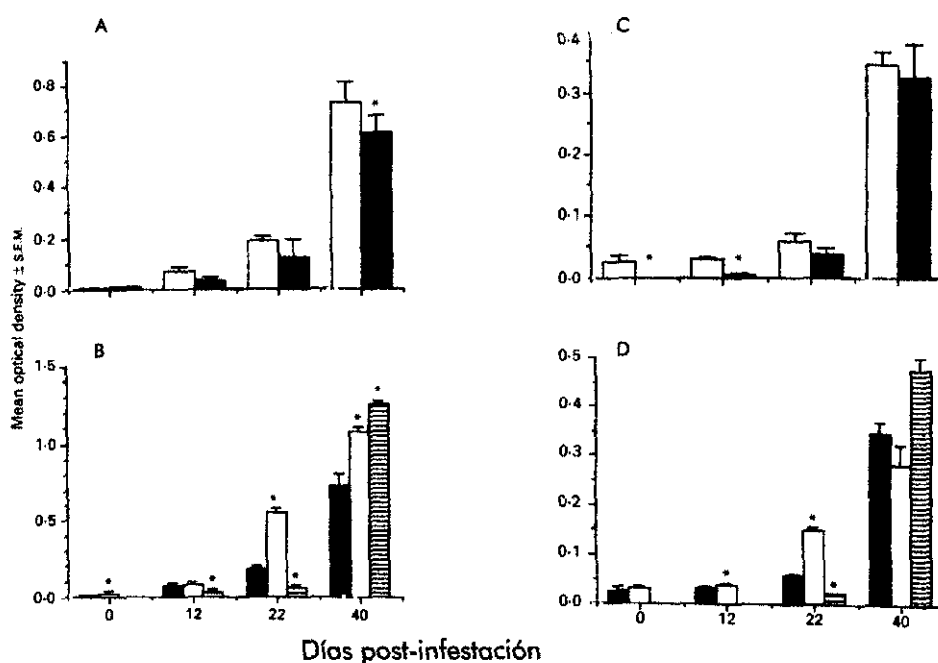


Figura 13. Niveles de IgG1 específica (A y B) e IgG2a (C y D) en ratones tras la infestación con 300 larvas de *T. spiralis* (A y C). Respuesta humoral con el aislado L en ratones NIH (blanco) y C57BL/10 (negro) medidos en ELISA contra el homogenado larvario. Un patrón similar se observaba con los otros dos aislados (B y D). Diferencias en la respuesta humoral frente a la infestación con cada aislado, medidas en ELISA contra los correspondientes antígenos larvarios, sólo en NIH. Se compararon los resultados del aislado P (blanco) y S (rayado) con el aislado L (negro) por el test de Mann-Whitney.

Además, las variaciones en los niveles de IgM e IgG observadas en los de baja respuesta respecto de los NIH, son reflejo de la distinta capacidad de la cepa de ratón para responder ; así por ejemplo, se sabe

que la cepa C57BL/10 responden frente a los estímulos antigénicos con grandes cantidades de IgM (Barth y col., 1965) . Finalmente observaron que había un incremento tanto de IgG1 como de IgG2a, lo que parece indicar que ambas subpoblaciones celulares Th1 y Th2 están activas, en concordancia con los resultados de Grencis y col., (1991). Los tres aislados inducen niveles diferentes de estos isotipos, sugiriendo nuevamente, diferencias inmunogénicas entre ellas, posiblemente por influencia de las células T implicadas en el control de cada isotipo. Sin embargo, las diferencias más interesantes eran las encontradas en los niveles de IgE, que eran más altos en los de baja respuesta, manteniéndose mientras los adultos estaban presentes, lo que implica que los niveles de IgE *per se* no están correlaciones directamente con la inmunidad protectora contra este estadio.

El aislado S induce niveles mucho más altos de IgE que los otros dos, siendo además las diferencias mucho más marcadas durante la fase intestinal. Estos hallazgos son interesantes, no solo desde el punto de vista del mecanismo de resistencia a la infestación, sino también de las respuestas alérgicas que acompañan a la triquinosis.

Ampliando el anterior estudio Goyal & Wakelin (1993b), prepararon extracto bruto salino, a partir de los tres aislados P, L y S anteriores, que habían sido caracterizados por isoenzimas como T1, con el fin de determinar la capacidad protectora de los mismos tras la inmunización frente a infestaciones homólogas y heterólogas. Dicha protección se midió por la aceleración de la expulsión de los adultos, reducción de la fecundidad, desarrollo de los adultos y nivel de anticuerpos antes y después de la infestación. En el caso de los aislados L y P, la reducción de

la carga intestinal tras la inmunización homóloga era del 64 y 51% respectivamente, mientras que en el aislado S solo se obtuvo un 4% a día 6 p.i. y un 43% a día 8 p.i.. En el caso de las infestaciones heterólogas, los aislados P y L presentaban un grado de protección similar, mientras que en el aislado S no se detectaba protección hasta día 8 p.i. La inmunización con el aislado S daba mejores niveles de protección frente al aislado L (77%) que con el P (37%). Los datos aquí recogidos muestran que la inmunización usando antígenos de los distintos aislados afectaba al curso de la infestaciones tanto homólogas como heterólogas, y las expulsiones en las heterólogas, lo que podría reflejar respuestas específicas a antígenos compartidos. Sin embargo parece que hay algunas diferencias significativas en el potencial de inmunización de los antígenos de los distintos aislados. El aislado S fue el menos efectivo en término de inmunización homóloga, aunque si fue efectivo frente a las heterólogas. Esto sugiere que el nivel de inmunización está también determinado por el estímulo proporcionado por la infestación posterior, y que los gusanos del aislado S son cuali- o cuantitativamente diferentes en algo crucial.

Los patrones proteicos en SDS-PAGE no permitían establecer diferencias entre aislados, al contrario que los Western-blot, tanto de sueros homólogos como heterólogos, que resultaron más útiles para este fin. Los aislados P y L mostraban una fuerte respuesta primaria a día 6 p.i. en las infestaciones homólogas, pero también en las heterólogas, lo que indica una íntima relación antigénica entre ambos. El aislado S mostraba un alto establecimiento de adultos en intestino, en una infestación primaria con producción de gran cantidad de embriones, sin embargo la inmunización con el extracto bruto salino no inducía protección homóloga a día 6 p.i., pero sí heteróloga. Observan también diferencias en los niveles

de anticuerpos totales y de los isotipos IgG1 e IgG2a ; aunque en los procesos de adsorción de los sueros hiperinmunes con los antígenos homólogos y heterólogos, se eliminaba la mayor parte de la respuesta.

Todas estas diferencias son fundamentales para el desarrollo de una vacuna contra estos parásitos, y se deben tener en cuenta a la hora de aplicarlas frente a aislados de diversos orígenes y que por tanto y *a priori* pueden ser diferentes, cuando el material inmune empleado procede de una población determinada y restringida, aunque se presuponga que los antígenos que son inmunodominantes y que participan en la protección sean comunes a todos los miembros de una misma especie.

Otro fenómeno analizado en estos estudios era la posibilidad de que el distinto patrón de comportamiento del aislado S pudiera ser debido a un fenómeno de supresión de la inmunidad dosis-dependiente, según habían señalado Wassom y col., (1984). Por ello, analizaron tres lotes infestados con 150, 300 y 450 larvas, determinando el número de adultos recuperados a día 6 y 8 p.i., sin embargo los niveles de establecimiento y la cinética de infestación era similar en ambos días y para las tres dosis, lo que implica que la baja inmunidad de este aislado no era consecuencia de una supresión relacionada con la dosis.

Goyal y col., (1994), completaron los anteriores estudios con pruebas de linfoproliferación y medición de citoquinas. La estimulación con el antígeno total de las larvas producía una fuerte proliferación de las células de ganglio linfático mesentérico, respondiendo más fuertemente al antígeno del aislado L que al de los otros dos aislados ; el antígeno del aislado P proporciona poca respuesta, existiendo reacción cruzada entre

todos los aislados. Cuando midieron las citoquinas también encontraron diferencias, así la producción de $\text{INF-}\gamma$ fue significativamente más alta en los ratones infestados con el aislado P; el aislado L mostraba una producción más elevada de IL-4 y IL-5 a día 4 p.i., mientras que a día 8 p.i. los niveles de IL-4 eran más bajos en el aislado P. Los niveles de IL-5 eran similares entre grupos. Con excepción de la IL-4, la producción de citoquinas a día 8 fue significativamente más baja en el aislado S ; también el nivel de $\text{INF-}\gamma$ a día 4 había sido más bajo. Es decir, las marcadas diferencias en la producción de citoquinas sugieren que cada aislado puede inducir preferentemente una subpoblación de células Th. Además encuentran que el aislado P tiene una menor respuesta con el antígeno homólogo que con los heterólogos, en contraste con el trabajo de Wassom y col., (1988), quienes encuentran una mayor respuesta en linfoproliferación en el caso de los antígenos homólogos.

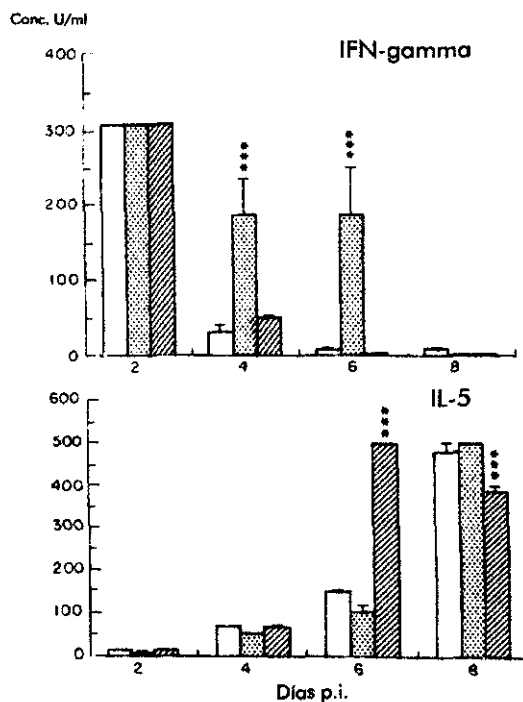


Figura 14. Producción de $\text{INF-}\gamma$ e IL-5 por las células ganglio linfático mesentérico de ratones NIH a intervalos de tiempo tras la infestación con 300 larvas del aislado London (L), Polish (P) y Spanish(S) de *T. spiralis*.

Aislado L
 Aislado P
 Aislado S

Los autores sugieren que hay un cambio muy rápido del patrón de citoquinas pasando de Th1 a Th2. Este cambio parece además depender del aislado empleado, así el aislado P mantiene unos niveles elevados de IFN- γ hasta día 6, mientras que los otros dos aislados muestran una dramática caída a día 2, es decir hay un cambio más rápido hacia la respuesta Th2.

Bolás-Fernández & Wakelin, (1992) realizaron también un análisis similar al anterior pero empleando aislados procedentes de la Península Ibérica y como cepa de referencia la London (L). Llevaron a cabo inmunizaciones con el antígeno de superficie extraído con CTAB. La inmunogenicidad de los aislados se midió por la capacidad de inducir la producción de anticuerpos, linfoproliferación y capacidad para estimular la inmunidad protectora frente a la reinfestación. Todos los aislados mostraban una considerable reacción cruzada, y todos inducían inmunidad protectora. Distinguían dos patrones de protección :

- Aislados que inmunizan contra las reinfestaciones heterólogas e inducen una buena inmunidad en los animales inmunizados con el aislado London (C-76 y Laso)
- Aislados que inmunizan poco contra las reinfestaciones heterólogas y fueron mucho menos efectivos en el caso de los ratones inmunizados con el aislado London (GM-1 y Mad-83).

Más recientemente Goyal y col., (1997) compararon la inmunización de ratones NIH frente a *T.spiralis* y *T.britovi* usando los productos de ES. Determinan que *T.britovi* es la más inmunogénica ya que, tanto en inmunización como en infestación, se consigue una mayor protección. A

nivel humoral las diferencias más marcadas se observaban en las respuestas de IgG1, sobre la infestación homóloga, los ratones inmunizados con *T.britovi* mostraban unos niveles mucho más elevados que en los inmunizados con la *T.spiralis*, debiéndose a que la primera es más eficaz en la inducción de respuestas de tipo Th2.

Santamarina y col., (1988a) estudiaron por la técnica de PCA (anafilaxis cutánea pasiva) distintos aislados en función de la reacción cruzada de las IgE inducidas por antígenos alérgicos de *T.spiralis* y *T.pseudospiralis*, en ratones BCF1 infestados con *T.spiralis*, *T.nelsoni* (C-76-actual T3), *T.nativa* y *T.pseudospiralis* y en ratas infestadas con *T.spiralis* y *T.pseudospiralis*. En los resultados observaron que, cuando en la PCA se usaba antígeno de *T.spiralis* se detectaban altos valores de IgE en el suero de animales infestados con *T.spiralis*, *T.nelsoni* (C-76), *T.nativa* pero no con *T.pseudospiralis*, durante la fase entérica del parásito. Estos resultados sugieren la existencia de un alto grado de identidad inmunológica entre los alérgenos de *T.spiralis*, *T.nelsoni* (C-76), *T.nativa*, pero no de *T.pseudospiralis*. En un segundo experimento, Santamarina y col., (1993) conseguían una reacción cruzada cuando los animales infestados por *T.spiralis* y por *T.pseudospiralis* se exponían por segunda vez. Además, la interrupción de una infestación primaria durante la fase entérica, no tenía efecto sobre la reacción cruzada de anticuerpos en respuesta a una reinfestación ; de hecho bastaba tan solo una exposición de 24 horas a los preadultos para inducir reacción cruzada. Los autores sugieren la existencia de dos tipos de alérgenos, unos principales que inducen IgE tras una infestación primaria y otros menores, menos inmunogénicos que inducen una respuesta detectable solo, tras una infestación secundaria o por la

destrucción de las larvas enquistadas, cuando los alérgenos principales han alcanzado un valor máximo.

Las variaciones en la respuesta inmune tanto a nivel intraespecífico como entre especies que hasta ahora hemos revisado se han llevado a cabo en animales de laboratorio, sin embargo parece que este fenómeno también se produce en humanos, así Bruschi y col., (1990) y Pozio y col., (1993), observaron diferencias en los brotes de triquinosis por *T.spiralis* y *T.britovi*. Las más importantes consistían en una mayor duración de los niveles de IgG específica, incremento de la creatin-fosfoquinasa, y una sintomatología intestinal más severa en los pacientes infestados con *T.spiralis*.

Hallazgos similares se han encontrado también en animales domésticos. En cerdos, Marinculic y col., (1991a) compararon las infestaciones por *T.spiralis* y *T.nativa*. A pesar de la baja infestabilidad de esta última en cerdos, se conseguían altos niveles de inmunidad frente a la infestación con *T.spiralis*, lo que se expresaba con una expulsión acelerada de los adultos del intestino y un menor número de L1 en músculo. Los cerdos infestados con *T.nativa* desarrollaban una respuesta celular y humoral similares a la de los cerdos infestados con *T.spiralis*. Sin embargo, en westernblot, los sueros de cerdos infestados con *T.nativa* reconocían proteínas adicionales en los productos de ES de la L1. Cuando los cerdos se inmunizaban con productos de ES de *T.nativa* se obtenían valores más altos, aunque no significativamente estadísticos, en comparación con los cerdos inmunizados con los productos de ES de *T.spiralis*. Los valores más

altos se conseguían en los cerdos inmunizados con el extracto bruto, preparado a partir de los embriones de *T.spiralis*. Sin embargo la combinación de los productos de ES y extracto de embriones no conseguía un efecto inmune aditivo.

Smith y col., (1990) analizan la infestabilidad de las dos especies anteriores (*T.spiralis* y *T.nativa*), pero en ganado ovino. La seroconversión se produce entre los días 7–14 p.i.. Sin embargo los niveles de anticuerpos en el caso de *T.nativa* eran más bajos que en los animales a los que se les había administrado el mismo número de larvas, pero de *T.spiralis*. En cualquier caso, los niveles de anticuerpos se incrementaron hasta el día 30 p.i., manteniéndose elevados hasta aproximadamente día 60 p.i. a partir del cual empezaron a disminuir. Coinciden ambas especies, sin embargo, en la seroconversión era más rápida que en otros animales como cerdos, “ponnies” y carneros. También hay que remarcar que la seroconversión esta asociada con la IgG 1 y la IgG2 y no con la IgA o la IgM.

También se han llevado a cabo una serie de estudios fundamentalmente con fines diagnósticos, así Figallova & Belozarov 1991 hacen un estudio sobre cuatro especies (*T.spiralis*, *T.nativa*, *T.nelsoni* – actual *T.britovi*– y *T.pseudospiralis*) utilizando los antígenos del extracto crudo larvario en ELISA, con el fin de determinar si todos eran igualmente válidos a la hora de realizar el serodiagnóstico frente a sueros de humanos y cerdos infestados. Concluyendo en el caso de los cerdos, que los mejores eran los antígenos de *T.nelsoni*, mientras que estos junto con los de

T.nativa, eran los que daban mejores resultados para el diagnóstico de la triquinelosis humana.

Navarrete y col., (1991), dada la problemática que se derivaba del empleo del triquinoscopio como método diagnóstico, llevaron a cabo la puesta a punto de una técnica ELISA para facilitar la detección de triquinosis en mataderos. El estudio se efectuó en cerdos autóctonos de Extremadura y como antígeno se empleó el de cinco aislados hispánicos (Laso, GM-1, C-76, CO-77 y Mad-83). Se prepararon distintos lotes antigénicos (un total de 8) a partir del homogenado de la larva, siendo empleados posteriormente en ELISA, bien solos o como mezclas de los mismos. Concluyen en la existencia de una gran similitud antigénica, no encontrándose diferencias significativas en la sensibilidad diagnóstica, según el origen del antígeno utilizado.

En un estudio paralelo, Bolas y col., (1993) comparan la dinámica de la respuesta humoral, también en cerdos, a la vez que la sensibilidad de los antígenos obtenidos de distintas fuentes : antígenos de ES, extracto bruto larvario y antígenos de superficie, en ELISA, empleando como en el caso anterior, lotes de antígenos únicos o combinaciones de los mismos. Cuatro de los aislados correspondían a *T. spiralis* (GM-1, CO-77, Laso y Mad-83) y uno a *T.britovi* (C-76). La dinámica de la respuesta fue muy similar en los aislados de *T.spiralis*, y con un marcado retraso en la aparición de títulos positivos y máximos de inmunoglobulinas en el grupo infestado por C-76, de baja infestabilidad para los animales domésticos. En ELISA, el antígeno más sensible fue el extracto crudo con positivos ya a días 6-16 p.i., mientras que en ES y CTAB era a día 16-20 p.i..

Igualmente, Serrano y col., (1992) analizaron el valor diagnóstico de los antígenos de cinco aislados de origen hispano (cuatro habían sido caracterizadas como *T.spiralis* y el quinto como *T.britovi*), comprobando además el efecto de la raza del cerdo sobre la respuesta humoral.

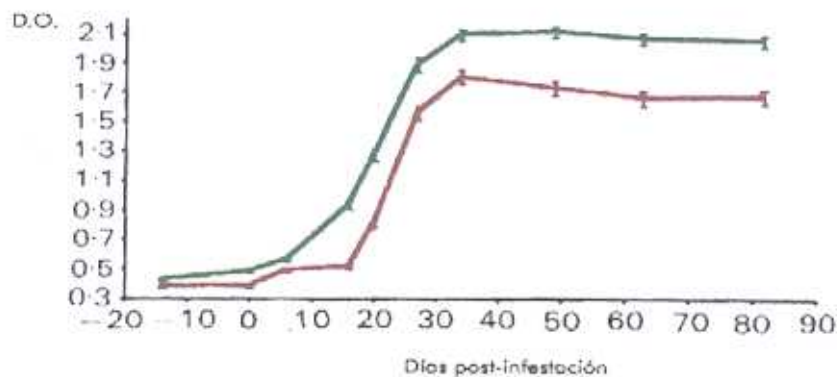


Figura 15. Resultados de los ELISAS de cerdos infestados experimentalmente con *Trichinella*. Cada línea muestra la media y la desviación standard obtenidas con todos los preparados antigénicos.

Raza blanca — Raza ibérica —

En el ELISA se probaron los extractos crudos larvarios por separado y una mezcla antigénica correspondiente a los extractos brutos de los aislados C, B1, B2, aislados de *T.spiralis* procedentes de animales salvajes, en distintas proporciones. Encontraron que los niveles más elevados de anticuerpos se obtenían en los lotes de cerdos infestados con el aislado P (*T.spiralis* de cerdo), a las tres dosis empleadas, siendo algo inferiores en los grupos correspondientes a los aislados C, B1 y B2. La respuesta más baja aparecía en el lote de animales correspondiente a la cepa de *T.britovi*. También detectan que, además de la influencia del antígeno, hay que tener en cuenta la influencia de la raza de cerdo.

Hasta el momento hemos revisado un grupo de estudios que, para paliar las posibles variaciones antigénicas y con el fin de estandarizar métodos diagnósticos, han tendido a analizar varios tipos de antígenos, (total, ES, de superficie), procedentes de diferentes hospedadores (cerdos y animales salvajes), de varias especies (T1 y T3) y en distinta proporción (solos o en mezcla). Hemos mencionado ya a lo largo de esta revisión la mayor especificidad de los productos de ES y de superficie y la importancia del empleo de proteínas purificadas con fines diagnóstico. En este sentido Gamble & Murrell (1986) llevaron a cabo un estudio en el que intentaron comprobar la validez del método ELISA, utilizando tanto los antígenos de ES como dos proteínas aisladas por medio de cromatografía de afinidad, una de 49 y otra de 59 kDa, para el diagnóstico de diferentes aislados de *Trichinella*. Probaron 25 sueros en ELISA que fueron positivos frente tanto a los productos de ES como a las proteínas aisladas Ts49 y Ts53, al igual que los controles definidos previamente como *T.spiralis*, *T.nativa* y *T.pseudospiralis*, si bien los aislados con baja infestabilidad daban bajos valores en ELISA.

El empleo de monoclonales ha permitido, no solo la purificación de proteínas sino también establecer diferencias entre las especies de *Trichinella* y por ello pueden ser útiles en el diagnóstico diferencial de especies. Wasson y col., (1988) obtuvieron un monoclonal que era capaz de reconocer un antígeno expresado en *T.pseudospiralis* que no compartía con *T.spiralis* y viceversa. Rodríguez-Pérez y col., (1989) prepararon otro monoclonal , el ES/TA2 que era capaz de reconocer siete componentes antigénicos en el extracto bruto de *T.spiralis* (entre 45 y 105 kDa), pero

solo cinco en *T.pseudospiralis* (entre 38 y 92 kDa). Es decir, compartían tres bandas de 50, 70 y 92 kDa. Aunque ambos preparados antigénicos presentaban patrones electrofóreticos muy similares en el rango de pesos moleculares reconocidos por este monoclonal, los patrones de reconocimiento por western-blot eran claramente diferentes, debido a la existencia de diferencias inmunológicas entre proteínas con peso molecular aparentemente idéntico.

Saito y col., (1994), analizan una serie de aislados de *T.spiralis* y de *T.pseudospiralis* de distinta procedencia por medio de dos monoclonales. Uno, el TY64, reaccionaba con una banda de 32 kDa, común para todos los aislados, mientras que el segundo monoclonal, TY10, permite establecer cuatro grupos de aislados :

- Grupo I . Constituido por los aislados de USA (U), Polonia (P), Thailandia (T) y China (C), en los que detectaban bandas a 42, 47, 65 y 67 kDa.
- Grupo II. Formado por dos aislados de Japón (Yamagata, Y ; Iwasaki, I), con tres bandas de 42, 47 y 67 kDa.
- Grupo III. Con el aislado escandinavo (S) con bandas a 42, 47 y 66 kDa
- Grupo IV. En el que se incluían los aislados de *T.pseudospiralis*, con bandas a 39, 60 y 70 kDa.

Los autores reconocen la utilidad de los monoclonales, no solo como método diagnóstico, sino también para la clasificación de los aislados.

Resumen de las principales diferencias entre las cinco especies de *Trichinella* propuestas por Pozio y col., (1992a).

*Se indica el número de isoenzimas únicos, detectados de entre los probados (La Rosa y col., 1992).

(1) Ainsworth y col., (1994) ; Bessonov, 1997 y Pozio y col., 1997.

CLASIFICACIÓN	DISTRIBUCIÓN	CEPA DE REFERENCIA	HOSPEDADOR	MARCADORES ISOENZIMÁTICOS*	ICR	FRAGMENTO DNA RIBOSOMAL	RESISTENCIA CONGELACIÓN	INFESTACIÓN EN HOMBRE
<i>T. spiralis</i> (T1)	Cosmopolita	MSUS/PO/60/I SS3	Mamíferos domésticos y silvestres	6	Alto en ratas y cerdos	4,8; 2,2, y 1,8 kb	No	Si
<i>T. nativa</i> (T2)	Zonas árticas y subárticas de la región Holártica	MURS/NO/84/I SS10	Mamíferos silvestres	2	Bajo en ratas y cerdos	2,2, y 0,7 kb	Alta	Si
<i>T. britovi</i> (T3)	Zona templada de la región Palearctica	mVUL/IT/82/I SS2	Mamíferos silvestres	1	Bajo en ratas y cerdos	2,2 y 1,8 kb	Baja	Si
<i>T. pseudospiralis</i> (T4)	Cosmopolita	MPRO/SU/72/I SS13	Aves y mamíferos silvestres	12	Muy bajo en cerdos y alto en ratas	4,8; 2,2; 1,8 y 0,7 kb	No	3 casos ⁽¹⁾
<i>T. nelsoni</i> (T7)	Africa	MCRO/KE/75/I	Mamíferos	4	Bajo en ratas y	1,8 Kb	No	Si

Resumen de las características de las poblaciones infrasubespecíficas de *Trichinella* y comparación con las poblaciones más semejantes según Pozio y col., (1992a)

⁽¹⁾Isoenzimas comunes con los grupos indicados según los datos de La Rosa y col., (1992) y Pozio y col., (1992a).

CLASIFICACIÓN	DISTRIBUCIÓN	CEPA DE REFERENCIA	RELACIÓN DE PROXIMIDAD ⁽¹⁾	RESISTENCIA A LA CONGELACIÓN	HOSPEDADORES	INFESTACIÓN EN HOMBRE
T5	Neártica templado	MURS/US/82/ISS 35	T8/ 1 isoenzima T3/ 3 isoenzimas	No	<i>U. americanus</i>	?
T6	Neártico templado	MUR/US/83/ISS3 4	T2/ isoenzimas T5/ 7 isoenzimas	Alta	<i>U. arctos horribilis</i> , <i>Gulo gulo</i> , <i>F. concolor</i> , <i>Urocyon cinereoargenteus</i>	?
T8	Sudafrica	MCRO/SA/66/ISS 124	T5/ 1 isoenzima T3/ 3 isoenzimas	No	<i>Crocuta crocuta</i> <i>Panthera leo</i>	?

OBJETIVOS

VIII. OBJETIVOS

En el amplio capítulo de revisión bibliográfica que precede se pone de manifiesto la abundante información que, a lo largo de los últimos cincuenta años, se ha ido generando en el campo de la inmunobiología de *Trichinella*. Sin embargo, a pesar del enorme desarrollo tecnológico que ha permitido la aplicación de métodos de alto poder resolutivo al análisis del genoma y a la expresión de genes de supuesta relevancia biológica, todavía quedan aspectos por dilucidar, como es la repercusión del polimorfismo genómico detectado en las diferentes especies y variantes subespecíficas, en la biopatología de las mismas y consecuentemente, en la gravedad de los trastornos que producen en sus hospedadores.

Los criterios basados en el comportamiento biológico propuestos por Dick en 1983, han sido objeto de una gran controversia y su validez para el establecimiento del nuevo *estatus* taxonómico de *Trichinella* todavía se cuestiona.

Por el contrario, los criterios de carácter bioquímico y, en particular los genómicos, permitieron el establecimiento de cinco especies y tres grupos subespecíficos relacionados. Sin embargo, aún no se ha investigado suficientemente la repercusión de la variabilidad genómica en la inmunobiología de las diferentes especies. La identificación de moléculas esenciales para el establecimiento, supervivencia e inmunogenicidad y su representación en las distintas especies y grupos es fundamental a la hora de diseñar pautas eficaces de diagnóstico, tratamiento y prevención de la enfermedad que producen.

Por ello, en el presente trabajo abordamos el estudio comparado de parámetros bioinmunológicos, en las especies y grupos subespecíficos de *Trichinella* existentes, centrándonos en los siguientes puntos :

1. Dada la disparidad de opiniones generadas en cuanto a la validez taxonómica de los criterios biológicos propuestos por Dick, efectuamos una revisión de los parámetros de capacidad infestante (establecimiento y distribución intestinal, larviposición, autocuración y establecimiento muscular).
2. Búsqueda de posibles marcadores bio-inmunológicos de la capacidad infestante. Una vez determinada la capacidad infestante de los aislados, mediante la valoración de los parámetros indicados en el apartado anterior, se aborda la caracterización parcial de los componentes somáticos y metabólicos, supuestamente implicados en los procesos de invasión y supervivencia, así como, en la inducción y modulación de la respuesta inmunitaria. Los parámetros a determinar son los siguientes :
 - Perfiles protéicos.
 - Actividades proteásicas.
 - Perfiles antigénicos.
 - Dinámica de la respuesta por anticuerpos específicos frente a la infestación e inmunización.
3. Búsqueda de moléculas de interés en la identificación de aislados y diagnóstico específico. Mediante la utilización de anticuerpos monoclonales se localizan epitopos relevantes en preparados antigénicos de las diferentes especies y se determina la capacidad de reconocimiento de esos epitopos, por los anticuerpos generados frente a la infestación e inmunización por esas especies.

MATERIALES Y REACTIVOS

IX. MATERIALES Y REACTIVOS

9.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

9.1.1. EN PRUEBAS BIOLÓGICAS

Se utilizaron ratones de la estirpe CD-1, con un peso medio de 30 g y de aproximadamente 35-40 días de edad, procurando que los lotes para las distintas pruebas fueran lo más homogéneos posible. Los animales de experimentación se alojaron en jaulas de macrolón PANLAB-1000 con cama de serrín, biberones para agua y pienso fabricado por la misma casa comercial. Estas jaulas, dispuestas en estanterías levantadas del suelo, se mantuvieron en una habitación cuya temperatura y humedad estuvieron regulados dentro de los márgenes fisiológicos.

9.1.2. EN PRUEBAS INMUNOLÓGICAS

Se utilizaron ratones machos consanguíneos de la estirpe Balb/C de dos meses de edad. Los animales se mantuvieron en las mismas condiciones que en el caso anterior.

9.2. AISLAMIENTOS DE *TRICHINELLA*

Para denominar cada cepa se ha seguido el código internacional propuesto por la Organización Mundial de la Salud para kinetoplástidos, ya que dicho código es el que emplea el Centro de Referencia de *Trichinella* (Pozio y col., 1989a). En esta nomenclatura se indica en primer lugar la clase de hospedador, seguido por las tres primeras letras del nominativo genérico del hospedador. En segundo lugar se indica el país de aislamiento y por último aparece el nombre dado al aislado, que en el caso de estar en la

colección del Centro de Referencia de *Trichinella*, se indicará como ISS, seguido del número correspondiente:

1.MFEL/SP/62/GM-1	Aislamiento hispano obtenido por J.Rodríguez de un gato montés (<i>Felis sylvestris</i>) naturalmente infestado en Pola de Lena (Asturias), en 1963 (Martínez Fernández, 1978). Identificado como <i>T.spiralis</i> s.s. (La Rosa y col., 1992).
2.MSUS/SP/74/POLE	Aislamiento hispano procedente de un cerdo doméstico (<i>Sus scrofa</i> var domestica) de Pola de Lena (Asturias) de 1974, identificado como <i>T. spiralis</i> s.s. (La Rosa y col., 1992).
3.MCAN/SP/76/C-76	Aislamiento hispano obtenido en 1976 de un lobo (<i>Canis lupus</i>), naturalmente infestado y capturado en Curtis (La Coruña); fue identificado en un principio como <i>T. nelsoni</i> (Martínez Fernández y col., 1978) y utilizado como cepa tipo europea de <i>T.nelsoni</i> (Pozio y col., 1987), siendo posteriormente caracterizada como <i>T.britovi</i> (La Rosa y col., 1992).
4.MCAN/SP/77/C-77	Aislamiento hispano ontenido de un lobo (<i>Canis lupus</i>) naturalmente infestado, capturado en Curtis (La Coruña) en 1977. Identificado como <i>T.nelsoni</i> por Martínez Fernández y col., (1978), fue más tarde caracterizado por La Rosa y col., (1992) como <i>T.spiralis</i> s.s.
5.MSUS/SP/77/CO-77	Aislamiento hispano procedente de un jabalí (<i>Sus scrofa</i> var. <i>fera</i>), capturado en Córdoba en 1977. Identificado como <i>T. nelsoni</i> por S.N. Boev (Martínez y col., 1981), fue posteriormente caracterizado por La Rosa y col., (1992) como <i>T spiralis</i> s.s.
6.MSUS/SP/82/HORMA	Aislamiento hispano procedente de un jabalí (<i>Sus scrofa</i> var <i>fera</i>) por el Prof. Martínez Gómez (Córdoba). Caracterizado como <i>T.spiralis</i> s.s. (La Rosa y col., 1992).
7.MSUS/SP/83/MAD-83	Aislamiento hispano procedente de un jabalí (<i>Sus scrofa</i> var. <i>fera</i>) cazado en Hormaechuelos (Córdoba) en 1983 y enviado al Prof. Martínez Gómez (Cordoba); identificándose como <i>T.spiralis</i> s.s. (La Rosa y col., 1992).
8.MVUL/SP/84/MONEGRILLO	Aislamiento hispano obtenido en 1984 de un zorro (<i>Vulpes vulpes</i>) cazado en Monegrillo (Zaragoza). Fue enviado por la Profa. Sánchez Acedo (Zaragoza) a nuestro laboratorio e identificado por La Rosa y col., (1992) como <i>T. britovi</i> .

9.MVUL/SP/84/ARRONIZ	Aislamiento hispano procedente de un zorro (<i>Vulpes vulpes</i>) capturado en 1984 en Arroniz (Zaragoza). Fue enviada por la Profa. Sánchez Acedo a nuestro laboratorio e identificado como <i>T.spiralis</i> s.s. (La Rosa y col., 1992).
10.MSUS/SP/89/J ₁ -89	Aislamiento hispano obtenido de un jabalí (<i>Sus scrofa</i> var. <i>fera</i>) cazado en 1989 en Avila. Caracterizado por La Rosa y col., (1992) como <i>T.spiralis</i> s.s.
11.MSUS/SP/90/J ₁ -90	Aislamiento hispano precedente de un jabalí (<i>Sus scrofa</i> var. <i>fera</i>) capturado en Escalona (Toledo) en 1990. Caracterizado por La Rosa y col.,(1992) como <i>T.spiralis</i> s.s.
12.MSUS/SP/90/J ₂ -90	Aislamiento hispano obtenido de un jabalí (<i>Sus scrofa</i> var. <i>fera</i>) en Granada, en 1990. Identificado como <i>T.spiralis</i> s.s. (La Rosa y col., 1992).
13.MPAN/SU/87/T-2 ASIA	Aislamiento procedente de un tigre (<i>Panthera tigris</i>) de Primorsk (Rusia). Identificado como <i>T. nativa</i> (La Rosa y col., 1992). fue proporcionado por E. Pozio del Istituto Superiore di Sanità de Roma (Italia) en 1991.
14.MURS/NO/84/T-2 TIPO	Aislamiento procedente de oso polar (<i>Ursus maritimus</i>). Ha sido adoptada como la cepa tipo de <i>T. nativa</i> por E. Pozio y col., (1987), quien la cedió a nuestro laboratorio en 1993.
15.MVUL/IT/82/T-3 ITALIA	Aislamiento proporcionado por E. Pozio en 1991, procedente de un zorro (<i>Vulpes vulpes</i>) capturado en Italia. Utilizada como cepa tipo de <i>Trichinella</i> tipo 3, <i>T.britovi</i> (Pozio y col., 1989b; Pozio y col., 1992a).
16.MFEL/US/85/T-6 F.C.	Aislamiento proporcionado por Pozio en 1991, obtenido de <i>Felis concolor</i> de Montana (Estados Unidos). Fue identificado por La Rosa y col., (1992) como <i>Trichinella</i> T6.
17.MURS/US/83/T-6 U.A.	Aislamiento procedente de un oso pardo (<i>Ursus arctos horribilis</i>) de Montana (Estados Unidos). Fue proporcionado por E. Pozio en 1991. Identificado como T6 (La Rosa y col., 1992).
18.MCRO/KE/75/T-7 K	Aislamiento obtenido de una hiena manchada (<i>Crocuta crocuta</i>) en Kenia. Fue cedido por E. Pozio en 1991. Utilizada como cepa tipo de <i>T. nelsoni</i> (Pozio y col., 1989b).

19.MPHA/TZ/82/T-7 T	Aislamiento cedido por E. Pozio en 1991, procedente de un facoquero (<i>Phacochoerus aethiopicus</i>) de Tanzania. Identificado como <i>T. nelsoni</i> (La Rosa y col., 1991).
20.MPAN/SA/89/T-8	Aislamiento procedente de un león (<i>Panthera leo</i>) del Parque Kruger (Sudáfrica). Caracterizado como <i>Trichinella</i> T8 por La Rosa y col., (1992). Fue proporcionada por E. Pozio en 1991.
21.MSUS/SP/90/J ₃ -90	Aislamiento hispano procedente de un jabalí (<i>Sus scrofa</i> var. <i>fera</i>) de la finca La Cebollada en Robregordo (Madrid), capturado en 1990 y enviado a nuestro laboratorio por el Laboratorio Municipal de Higiene.
22.MSUS/SP/91/J ₁ -91	Aislamiento hispano obtenido de un jabalí (<i>Sus scrofa</i> var. <i>fera</i>) capturado en La Granja (Segovia) en 1991.
23.MVUL/SP/91/Z ₁ -91	Aislamiento hispano procedente de un zorro (<i>Vulpes vulpes</i>), cazado en Segovia en 1991.
24.MSUS/SP/92/J ₁ -92	Aislamiento hispano procedente de un jabalí (<i>Sus scrofa</i> var. <i>fera</i>), capturado en el Patrimonio Nacional del Pardo (Madrid) en 1992.
25.MSUS/SP/93/J ₁ -93	Aislamiento hispano obtenido de un jabalí (<i>Sus scrofa</i> var. <i>fera</i>) abatido en el norte de Palencia en 1993.
26.MSUS/SP/93/J ₄ -93	Aislamiento hispano obtenido de un jabalí (<i>Sus scrofa</i> var. <i>fera</i>) en Berganzo (Alava). La muestra fue remitida por González Navarro, del Servicio Territorial de Sanidad y Bienestar Social de Burgos.
27.MSUS/SP/93/J ₆ -93	Aislamiento hispano procedente de un jabalí (<i>Sus scrofa</i> var. <i>fera</i>) en Riaño (León) en 1993. Fue remitido por el Departamento Provincial de Sanidad y Consumo de León.
28.MSUS/SP/93/C ₁ -93	Aislamiento hispano procedente de un cerdo doméstico (<i>Sus scrofa</i> var. <i>domestica</i>), sacrificado en 1993 en Pamplona (Navarra).
29.MSUS/SP/93/C ₂ -93	Aislamiento hispano hallado en 1993 en un cerdo doméstico (<i>Sus scrofa</i> var. <i>domestica</i>) en Navarra. La muestra fue enviada por B. Sesma, de la Sección de Laboratorio del Instituto de Salud Pública de Pamplona.
30.MCAN/SP/93/L ₁ -93	Aislamiento hispano obtenido de un lobo (<i>Canis lupus</i>) abatido en Aguilar del Campo, Natar (Palencia). Fue enviado por F. Paredes, de la Jefatura de Ganadería de Palencia.

9.3. REACTIVOS GENERALES

➤ **Solución salina.**

-ClNa	9 g
-Agua destilada	1000 ml

Esterilizar en autoclave.

➤ **Tampón PBS 10X.**

-NaH ₂ PO ₄ • H ₂ O	2,5 g
-Na ₂ HPO ₄ • 7H ₂ O	22,4 g

Disolver en aproximadamente 500 ml de agua destilada.

Ajustar el pH a 7,2–7,4.

-ClNa	87,6 g
-------	--------

Llevar a un volumen final de 1 litro.

Diluir a 1/10 antes de usar, resultando un tampón final fosfato 0,01 M y ClNa 0,15 M.

9.4. MEDIOS DE CULTIVO

- **Medio Mínimo Esencial con Sales de Earle** (Sigma) adicionado de L-glutamina 2 mM, Hepes 10 mM, penicilina (50 unidades/ml) y estreptomicina (50 µg/ml), ajustándose el pH a 7,2–7,4 y posterior esterilización por filtración a través de membrana de 0,20 µm.

➤ **Solución de Hanks**

-ClNa	8 g
-ClK	0,4 g
-SO ₄ Mg • 7H ₂ O	0,2 g
-PO ₄ HNa ₂ • 12H ₂ O	0,15 g
-PO ₄ H ₂ K	0,06 g

-Cl ₂ Ca	0,14 g
-Rojo fenol 0,2%	5 ml
-Glucosa • H ₂ O	1 g
-H ₂ O destilada	c.s.p. 1000 ml

Esterilizar por filtración y conservar a -4°C.

9.5. REACTIVOS DE ELECTROFORESIS

➤ Acrilamida/Bisacrilamida (30 : 0,8)

-Acrilamida (BioProbe)	30 g
-Bisacrilamida (BIORAD)	0,8 g

Se lleva hasta un volumen de 100 ml de agua destilada, la solución final se filtra con papel Whatman n°1, y se almacena en oscuridad y a 4° hasta su uso.

➤ Tampón 3 M Tris-ClH, pH 8,8 ("Resolving")

-Tris (Merck)	36.3 g
-Agua destilada c.s.p.	100 ml

Se disuelve la totalidad del Tris en aproximadamente 75 ml de agua destilada, ajustándose a continuación el pH a 8.8 con ClH 1N, y enrasando finalmente el volumen hasta 100 ml de agua destilada. Se filtra con papel Whatman n°1 y se almacena a 4°C hasta su uso.

➤ Tampón 0.5 M Tris-ClH, pH 6.8 ("Stacking")

-Tris (Merck)	6.0 g
-Agua destilada c.s.p.	100 ml

Se disuelve la totalidad del Tris en aproximadamente 75 ml de agua destilada, ajustándose el pH a 6.8 con ClH, y enrasando finalmente el volumen a 100 ml con agua destilada. se filtra con papel Whatman n° 1 y se almacena a 4°C.

➤ **Tampón de electroforesis 10X, pH 8.3 ("Reservoir buffer")**

- Tris (0.25 M)	30.3 g
- Glicina (1.92 M) (Amresco)	144 g
- SDS (1%) (Sigma)	10 g
- Agua destilada c.s.p.	1000 ml

Almacenar a 4°C. Reconstituir en el momento de su uso.

➤ **Amonio persulfato**

-Amonio persulfato (Merck)	0,05 g
-Agua destilada	3 ml

La disolución se prepara justo en el momento de su uso.

➤ **SDS 10%**

-SDS (Sigma)	10 g
-Agua destilada	100 ml

➤ **Tampón de muestra**

-Agua destilada	4 ml
-0.5 M Tris-ClH, pH 6.8	1 ml
-Glicerol (Merck)	1.6 ml
-SDS 10%	0.8 ml
-Azul de bromofenol 0.05% (p/v)(Merck)	0.2 ml

En el caso de que se requieran condiciones reductoras se añadirá a la mezcla un 10% de β -mercaptoetanol.

9.6. TÉCNICA DE TINCIÓN DE PROTEÍNAS**> Tinción con azul de Coomasie**

-Azul de Coomasie R-250 (Merck)	0,25 g
-Metanol	125 ml
-Acido acético	25 ml
-Agua destilada	100 ml

> Decoloración

-Metanol	10 ml
-Acido acético	10 ml
-Agua destilada	80 ml

> Marcadores de peso molecular

- Preteñidos de amplio rango (6.500–205.000 Da, Bio–Rad).
- De amplio rango (2.500–200.000 Da, Mark 12 Novex).

9.7. REACTIVOS DE ELISA**> Tween 20**

-Tween 20	0.5 ml
-P.B.S. c.s.p.	1000 ml

> Tampón carbonato 0.1 m

-CO ₃ Na ₂	3.2 g
-CO ₃ Na	5.9 g
-Agua destilada c.s.p.	1000 ml

Ajustar el pH a 9.6 y conservar a 4°C

➤ **Solución de post-tapizado**

-B.S.A. (Fracción V-Sigma)	1 g
-P.B.S.-Tween 20 c.s.p.	1000 ml

➤ **Tampón citrato-fosfato**

A. Citrato 0.1 M

-Acido cítrico	21 g
-Agua destilada c.s.p.	1000 ml

B. Fosfato 0.2 M

-Fosfato disódico hidratado	35,6 g
-Agua destilada c.s.p.	1000 ml

Para obtener el tampón se prepara la siguiente mezcla:

- A	100 ml
- B	100 ml
- Agua destilada c.s.p.	400 ml

Ajustar el pH a 5.

➤ **Conjugados (Caltag Laboratories)**

Se emplearon los siguientes conjugados todos ellos marcados con peroxidasa:

- Inmunoglobulinas de cabra anti-ratón IgG.
- Inmunoglobulinas de cabra anti-ratón IgM.
- Inmunoglobulinas de cabra anti-ratón IgA.
- Inmunoglobulinas de cabra anti-ratón IgG1.
- Inmunoglobulinas de cabra anti-ratón IgG2a.
- Inmunoglobulinas de cabra anti-ratón IgG2b.
- Inmunoglobulinas de cabra anti-ratón IgG3.

➤ **Sustrato**

- O-fenileno-diamina (O.P.D.) (Sigma) 40 mg
- Tampón citrato-fosfato 100 ml

Disolver el O.P.D. en el tampón y en el momento de su uso, añadir un 30% de H_2O_2 manteniendo la mezcla en ausencia de luz.

➤ **Solución de frenado (Ácido sulfúrico 3N)**

- SO_4H_2 80 ml
- Agua destilada c.s.p. 500 ml

9.8. REACTIVOS DE WESTERN-BLOT

➤ **Tampón de electrotransferencia**

- Glicina (39mM) 2,93 g
- Tris (48 mM) 5,81 g
- SDS (0,0375% p/v) 0,375 g
- Metanol (20% v/v) 200 ml
- Agua destilada c.s.p. 1000 ml

➤ **Solución de bloqueo**

- Leche desnatada Sveltesse Nestlé 5 g
- PBS 100 ml

➤ **Solución de revelado**

-Solución A

- H_2O_2 6 μ l
- PBS 10 ml

-Solución B

- 4-Cloro-1-naftol (Sigma)	0.03 g
- Metanol	10 ml

Preparar las soluciones en el momento de su uso y mezclarlas en oscuridad con la precaución de añadir la solución B sobre la A.

9.9. TAMPONES PARA DETECCIÓN DE GLICOPROTEÍNAS**➤ TBS (50 mM Tris ; 27 mM ClNa, pH 7,2)**

-Tris	6.05 g
-ClNa	1.60 g
-Agua destilada	1000 ml

➤ Tampón acetato sódico 200 mM pH 5,5

Mezclar las siguientes soluciones :

-Solución A

-Acetato sódico • 3H ₂ O	12 g
-Agua destilada	440 ml

-Solución B

-Acido acético glacial	690 µl
-Agua destilada	60 ml

➤ Tampón de desarrollo de color

-Tris	1.21 g
-MgCl ₂ • 6 H ₂ O	1.01 g
-ClNa	0.58 g
-Agua destilada	90 ml

Disolver los reactivos en los 90 ml de agua destilada, ajustar a continuación el pH a 9.5 y enrasar a 100 ml.

➤ **PBS (Fosfato sódico 9 mM, Cloruro sódico 27 mM, pH 7.2)**

-Na ₂ HPO ₄	575 mg
-NaH ₂ PO ₄	100 mg
-ClNa	800 mg
-Agua destilada	500 ml

➤ **Tampón acetato sódico 100 mM/EDTA 5mM**

Disolver 1.14 g de EDTA en 300 ml de la solución de acetato sódico 200 mM, (pH 5.5) preparado anteriormente y llevar hasta un volumen final de 600 ml de agua destilada.

➤ **Solución de periodato**

Disolver 21.4 mg del reactivo proporcionado por la casa comercial en 10 ml de la solución de acetato sódico/EDTA.

➤ **Solución de bloqueo**

Disolver 0.5 g del reactivo de bloqueo proporcionado por la casa comercial en 100 ml de TBS. Si fuera necesario calentar a 60°C durante 45 minutos para disolver.

9.10. MATERIAL DE LABORATORIO

- Cámaras McMaster
- Copas de sedimentación
- Cubetas espectrofotometría Dispolab Kartell 1940 PS
- Chupetes de goma

- Espátulas
- Frascos de cultivo celular COSTAR Roux 250 ml.
- Filtros Millipore 0.22
- Gasas estériles
- Homogenizadores de vidrio
- Matraces de vidrio de 100, 250, 500 y 1000 ml (Pyrex)
- Membranas de nitrocelulosa de 0.2 μm (Pharmacia)



Figura 16. Pipeta automática y pipeta multicanal Biohit

- Papel de filtro
- Pinzas y tijeras
- Pipetas de 5 y 10 ml
- Pipetas Pasteur
- Pipetas automáticas
- Pipetas multicanal de 8 puntas de 50, 100 y 200 μl .
- Placas 24 pocillos COSTAR 3524 de fondo plano
- Placas de microtitulación Polysorp Surface. NUNC Brand Products.

- Placas Petri
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Probetas de 50, 100, 250 y 1000 ml
- Puntas de pipeta de polipropileno de 20, 25, 100, 200 y 1000 μl
- Tubos eppendorf de polipropileno de 1 y 1.5 ml
- Tubos de 15, 25 y 50 ml de polipropileno para centrifuga
- Tubos de diálisis Visking Medicell 24/32"

9.11. APARATOS

- Agitador magnético Agimatic-S P.Selecta
- Agitador 3D Rocking Platform STR9 Stuart Scientific
- Autoclave Climamatic, P.Selecta
- Balanza Mettler PC 2200 Delta Range
- Balanza de precisión Metler AE100
- Baño Unitronic P.Selecta
- Campana de flujo Teistar
- Centrífuga refrigerada BioFuge 17RS Heraeus Sepatech
- Espectrómetro de placas Elx800 Biotek Instruments
- Espectrómetro Ultrospec III (Pharmacia LKB)
- Estufa de 37°C P.Selecta
- Estufa de 37°C y CO₂ Heraeus Instruments
- Fuente de electroforesis Pharmacia LKB ECPS 3000/150
- Horno Memmert
- Incubador y agitador de temperatura controlada New Brunswick Scientific
- Microcentrífuga MSE Microcentaur
- Microscopio invertido Olympus MI.
- Microscopio Olympus CH30
- pHmetro Micro-pH 2000-CRISON
- Sonicador Virsonic 50 Virtris
- Sistemas de filtración (Nalgene)
- Unidad de electrotransferencia 2117 Multiphor II Pharmacia LKB
- Unidades de concentración y membranas YM-10 Amicon.

MÉTODOS Y RESULTADOS I.
ESTUDIOS BIOLÓGICOS

X. ESTUDIO COMPARADO DE LA CAPACIDAD INFESTANTE DE LAS ESPECIES DE *TRICHINELLA*

10.1. ASENTAMIENTO MUSCULAR EN RATÓN : DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD REPRODUCTIVA

Este estudio se llevó a cabo sobre 12 aislados pertenecientes a diferentes especies quísticas, que habían sido caracterizados previamente por isoenzimas, en el Centro de Referencia de Trichinellosis (Istituto Superiore di Sanità, Roma).

10.1.1. AISLAMIENTOS DE *TRICHINELLA*

Para las pruebas biológicas empleamos los siguientes aislados :

- *T.spiralis* GM-1
- *T.spiralis* C-77
- *T.nativa* *P.tigris*
- *T.nativa* Noruega
- *T.britovi* C-76
- *T.britovi* Italia
- *T.britovi* Monegrillo
- T6 *F.concolor*
- T6 *F.arctos*
- *T.nelsoni* Kenia
- *T.nelsoni* Tanzania
- T8 *P.leo*

10.1.2. OBTENCIÓN Y RECUENTO DE LARVAS L1.

Los animales, previamente infestados y mantenidos como *stock* fueron sacrificados por dislocación cervical, se les quitó la piel y a continuación

fueron eviscerados. Para acelerar el proceso de digestión las canales de los ratones se trituraron en una picadora de carne Moulinex modelo D56.

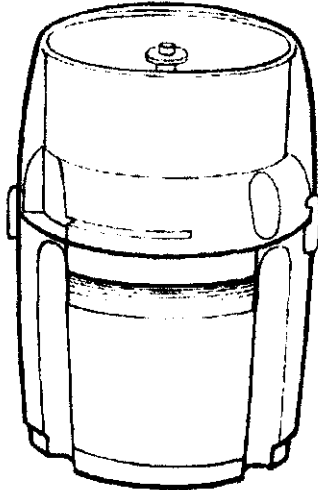


Figura 17. Picadora de carne Moulinex modelo D56.

A continuación se añadió el líquido digestivo, constituido por un 0,5% de pepsina 1 : 10.000 (Merck), 0,7% de HCl concentrado (Panreac) y 0,9% de NaCl cristalizado (Panreac) en agua destilada, siendo la proporción carne / líquido de 1/10 (p/v). La mezcla así preparada se dispuso en botes de plástico con tapón de rosca y de capacidad 1000 ml, dejando un espacio de cabeza de al menos un tercio de este volumen. A continuación, dichos botes se dispusieron en un agitador-incubador (G24 Environmental Incubator Shaker; New Brunswick Scientific) a 37°C y 200 r.p.m., durante 90 minutos, con lo que se conseguía liberar las larvas enquistadas en músculo.

Una vez terminado el proceso de digestión, se prepararon copas de decantación con gasas, de forma que se hacía pasar el contenido de los botes a través de las mismas, para eliminar los restos de las canales no digeridos. Se dejó reposar durante al menos 20 minutos y a continuación se sifonó parte del líquido sobrenadante, y el sedimento se pasó a tubos de 50 ml con nuevas gasas y una vez sedimentadas, las larvas limpias se recogieron en un vaso de precipitados.

A continuación se procedía al recuento de las larvas, empleando una cámara de McMaster y un microscopio Olympus a 4x. Para conseguir que el recuento fuera lo más homogéneo posible y dado que las larvas sedimentan

en el fondo, el vaso de precipitados con las larvas se colocaba sobre un agitador magnético, y por medio de una pipeta Pasteur provista de un bulbo de goma, se tomaba una alícuota con la que se llenaba la cámara.

Se realizaron 4 recuentos, calculándose la media aritmética y el resultado se multiplicaba por el factor de la cámara (6.66), con lo que se obtenía el número de larvas por ml, que multiplicado por el volumen total en que se encuentran las larvas, nos daba el número total de larvas. Para administrar la dosis infestante se hacen los cálculos necesarios, teniendo en cuenta el número de larvas que se quieren inocular, el volumen máximo de líquido que son capaces de admitir los animales y la susceptibilidad de los mismos a los inóculos. En caso de que fuera necesario diluir la solución se empleaba solución salina y para concentrar se dejaba reposar nuevamente y una vez sedimentadas las larvas se sifonaba el exceso de sobrenadante, volviéndose a efectuar un nuevo recuento, en cualquiera de los casos, para comprobar que se mantenía la dosis.

La dosis calculada se administraba por vía oral mediante una sonda buco-gástrica (aguja de jeringuilla de metal con extremo romo y jeringuilla de insulina de 1 ml).

10.1.3. NIVEL DE ASENTAMIENTO MUSCULAR

La carga o asentamiento muscular es una de las características biológicas más ampliamente utilizada en la caracterización de aislados, ya que se la considera constante y predecible para un mismo aislado y hospedador ; en este apartado pretendemos determinar si además esta característica es estable entre los aislados que se han agrupado dentro de una misma especie por otras técnicas, o en caso contrario, pueda servir como indicador de variaciones intraespecíficas.

Se infestaron experimentalmente lotes de 8-10 ratones CD-1 con 500, 700, 900, 1100 y 1300 larvas de cada una de los aislados indicados en el apartado anterior. A día 40 p.i., en que se encuentra perfectamente formado el quiste muscular, los ratones fueron sacrificados y se evaluó el asentamiento muscular mediante el recuento total de larvas aisladas en cada ratón, siguiendo la técnica descrita en el apartado 10.1.2.

En la tabla I se recogen los niveles de asentamiento muscular en todos los aislados de *Trichinella* indicados en el apartado 10.1.1., tras la administración experimental de diferentes dosis de larvas L1 por vía oral (500, 700, 900, 1100 y 1300), expresando el número de total de larvas recuperadas como la media aritmética y el error estándar.

Tabla I. Nivel de asentamiento muscular de los aislados de *Trichinella* para las dosis ensayadas (500, 700, 900, 1100 y 1300 larvas por vía oral) expresado como $\bar{X} \pm E.S.$

AISLADOS	ASENTAMIENTO MUSCULAR (N° Larvas)				
	DOSIS INFESTANTE				
	500	700	900	1100	1300
T1 GM-1	139.481,75 $\pm 26.601,20$	183.316,44 $\pm 22.855,47$	278.721,00 $\pm 38.025,17$	231.250,00 $\pm 21.523,21$	209.390,40 $\pm 29.932,31$
T1 C-77	148.388,44 $\pm 12.367,46$	169.476,38 $\pm 18.961,66$	190.904,14 $\pm 25.572,20$	271.062,00 $\pm 34.539,66$	228.247,71 $\pm 48.436,87$
T2 <i>P.tigris</i>	20.379,60 $\pm 2.505,16$	35.936,25 $\pm 7.059,85$	33.599,70 $\pm 5.488,49$	47.323,00 $\pm 7.527,45$	69.930,00 $\pm 9.356,22$
T2 Noruega	112.237,90 $\pm 9.890,12$	134.384,00 $\pm 23.521,73$	226.440,00 $\pm 18.785,11$	191.617,71 $\pm 25.033,27$	215.617,50 $\pm 44.957,57$
T3 C-76	68.053,27 $\pm 6.095,55$	85.766,00 $\pm 16.565,53$	128.687,80 $\pm 9.616,18$	178.155,00 $\pm 23.872,04$	182.916,90 $\pm 28.424,41$
T3 Monegrillo	57.609,00 $\pm 5.311,09$	77.139,40 $\pm 9.602,60$	85.878,90 $\pm 13.543,21$	123.432,00 $\pm 19.962,88$	149.332,22 $\pm 13.603,84$
T3 Italia	59.016,20 $\pm 10.137,55$	76.853,30 $\pm 5.919,02$	56.295,67 $\pm 8.219,20$	89.710,50 $\pm 8.286,99$	46.184,10 $\pm 11.158,24$
T6 <i>F.concolor</i>	29.988,56 $\pm 6.765,70$	40.449,13 $\pm 6.200,50$	44.111,40 $\pm 6.919,34$	37.462,56 $\pm 7.701,82$	37.512,50 $\pm 6.528,57$
T6 <i>U.arctos</i>	27.413,33 $\pm 7.660,62$	40.293,00 $\pm 5.610,28$	40.892,40 $\pm 6.702,38$	32.005,11 $\pm 6.366,97$	31.339,00 $\pm 2.905,91$
T7 Kenia	52.164,50 $\pm 7.088,97$	89.743,56 $\pm 10.082,67$	113.275,56 $\pm 15.520,20$	139.804,78 $\pm 13.050,43$	153.762,75 $\pm 12.395,63$
T7 Tanzania	52.336,78 $\pm 8.665,97$	68.806,25 $\pm 15.793,34$	72.044,70 $\pm 8.138,65$	60.356,50 $\pm 8.570,25$	65.717,60 $\pm 7.667,45$
T8 <i>P.leo</i>	41.733,67 $\pm 3.167,87$	38.552,56 $\pm 5.750,21$	56.425,11 $\pm 3.343,29$	68.785,22 $\pm 3.823,42$	86.691,11 $\pm 11.344,05$

10.1.4. CÁLCULO DEL ÍNDICE DE CAPACIDAD REPRODUCTIVA (ICR)

Asimismo, se determinaron los ICR (Índice de Capacidad Reproductiva) de cada uno de los aislados ; índice que se define como el cociente entre el número de larvas musculares recuperadas y el número de larvas administradas (Belosevic & Dick, 1979). Recogiéndose en la tabla II, los resultados para cada una de las dosis previamente indicadas, expresados como la media aritmética y el error estándar.

Tabla II. Índices de capacidad reproductiva de los aislados de *Trichinella* para las dosis ensayadas (500, 700, 900, 1100 y 1300 larvas por vía oral) expresados como $\bar{X} \pm E.S.$

AISLADOS	ÍNDICE DE CAPACIDAD REPRODUCTIVA (ICR)				
	DOSIS INFESTANTE				
	500	700	900	1100	1300
T1 GM-1	278,96±53,20	261,88±32,65	309,69±45,25	210,22±19,56	161,06±23,03
T1 C-77	296,77±24,73	242,10±27,08	212,11±28,41	246,42±31,39	175,57±37,25
T2 <i>P.tigris</i>	40,75 ±5,01	51,33 ±10,08	37,33 ±6,09	43,02 ±6,48	53,79 ±7,19
T2 Noruega	224,47±19,78	191,97±33,60	251,60±20,87	174,19±22,75	165,85±34,58
T3 C-76	136,10±12,19	122,52±23,66	142,98±10,68	161,95±21,70	140,70±21,86
T3 Monegrillo	118,03±20,27	109,79 ±8,45	62,55 ±9,13	81,55 ±7,53	35,52±8,58
T3 Italia	115,2±10,62	110,19±13,71	95,42 ±15,04	112,21±18,14	114,87±10,46
T6 <i>F.concolor</i>	59,97 ±13,53	57,78 ±8,85	49,01 ±7,68	34,05±7,00	28,85±5,02
T6 <i>U.arctos</i>	54,82 ±15,32	57,56 ±8,01	45,43 ±7,44	29,09 ±5,78	24,10 ±2,23
T7 Kenia	104,32±14,17	128,20±98,29	125,86±17,24	127,09±11,86	118,27 ±9,53
T7 Tanzania	104,67±17,33	98,29 ±22,56	80,04±9,04	54,86 ±7,79	50,55 ± 5,89
T8 <i>P.leo</i>	83,46 ±6,33	55,07 ±8,21	62,69 ±3,71	62,53 ±3,47	66,68 ±8,75

10.1.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el estudio estadístico se realizó un análisis de la varianza, técnica estadística que permite comprobar si dos o más muestras proceden de poblaciones con la misma media paramétrica, respecto de una variable dada, de forma que en caso de que presentaran medias muestrales diferentes cabría suponer que procederían de poblaciones distintas. Tiene además como ventaja frente a la *t de Student*, el ser un método general que permite comparar más de dos muestras (Sokal & Rohlf, 1979). En el caso de querer analizar el efecto de dos factores sobre una misma variable se ha recurrido al análisis bifactorial de la varianza.

10.1.5.1. SOBRE LA VARIABLE “NÚMERO DE LARVAS”

Sobre esta variable se llevó a a cabo un análisis bifactorial de la varianza (dosis/aislado) ; indicándose el nivel de significación estadístico por medio del valor P. El modelo incluía además la determinación del efecto interactivo de ambos factores para comprobar que los aislados de una misma especie, mantenían una tendencia similar para la variable estudiada, en función de la dosis. El efecto interactivo se define como el efecto de un factor sobre el nivel del otro factor, es decir, indica si los efectos de los dos factores no son simplemente aditivos, sino que cualquier combinación dada de los niveles de ambos, pueda contribuir de manera positiva o negativa al nivel de expresión de la variable. Además, en el caso de que la interacción fuera significativa ($P < 0.05$) se recurrió para cada aislado, a un nuevo análisis de la varianza, en este caso unifactorial, sobre el factor dosis. Si éste a su vez era significativo ($P < 0.05$) se aplicaba el test de comparaciones multiples de Duncan, basado en la comparación de las medias aritméticas (con un nivel de significación $P < 0.05$), con el fin de

detectar cuales eran las dosis responsables de esta significatividad. En aquellos casos en que el efecto interactivo no fué significativo, se analizaron por separado los efectos de la dosis y del aislado, y por último, si cualquiera de estos dos factores eran significativos ($P < 0.05$), se llevó a cabo un análisis de Duncan (en el caso del factor aislado, este último análisis solo se realizó en el caso de que se dispusiera de más de dos aislados).

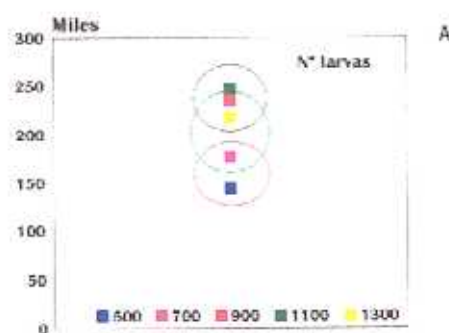
En las tablas III a VIII se muestran los resultados de los P-valores obtenidos en los test correspondientes a los análisis de la varianza bifactorial (aislado/dosis) y unifactorial (cuando fue necesario), para cada una de las especies. En las gráficas A–H se representan esquemáticamente los resultados obtenidos en aquellos casos en que fue necesario aplicar el test de comparaciones múltiples de Duncan, de forma que las dosis agrupadas dentro de la misma circunferencia no eran estadísticamente diferentes.

- *T.spiralis*

En la tabla III observamos que el efecto interactivo no fue significativo, por tanto el test no permite encontrar tendencias diferentes en el comportamiento de ambos aislados, en función de la dosis. Cuando analizamos los dos factores por separado vemos que, sin embargo, este test sí encuentra diferencias entre las dosis medias de ambos aislados, por ello se procedió a realizar el test de Duncan, cuyos resultados se esquematizan en las gráficas A.

Factor	Nº larvas
Aislado	0.7065
Dosis	0.0017*
Aislado/dosis	0.2546

Tabla III. Resultados de los P-valores del análisis bifactorial de la varianza para los aislados de la especie *T.spiralis* (GM-1 y C-77). Los valores marcados con asterisco resultaron significativos (*) $P < 0.05$.



- *T.nativa*

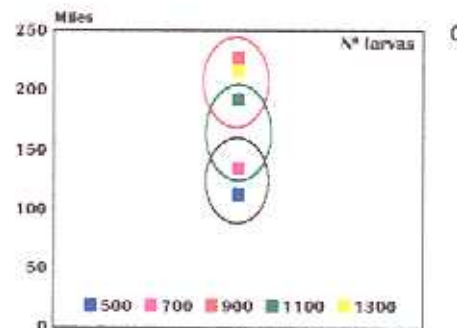
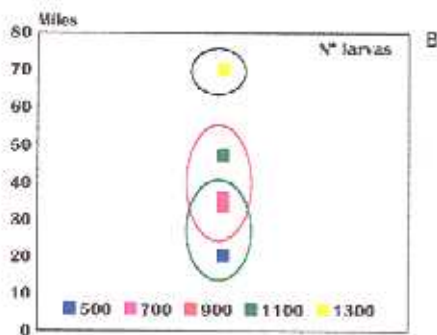
Según se aprecia en la tabla IVa, el efecto interactivo fue significativo, de forma que pasamos a realizar el correspondiente análisis unifactorial de la varianza sobre el factor dosis, para cada uno de los aislados, siendo significativo en ambos casos según se indica en la tabla IVb, por lo que se procedió al análisis de Duncan, cuyos resultados se muestran en las gráficas B (para el aislado *P.tigris*) y C (para el aislado Noruega).

Factor	Nº larvas
Aislado	0.0001*
Dosis	0.0001*
Aislado/dosis	0.0050*

Tabla IVa. Resultados de los P-valores del análisis bifactorial de la varianza para los aislados de la especie *T.nativa* (*P.tigris* y Noruega). Los valores marcados con asterisco resultaron significativos (*) $P < 0.05$

Factor	T2 <i>P.tigris</i>	T2 Noruega
Dosis	0.0001*	0.0018*

Tabla IVb. Resultados de los P-valores del análisis unifactorial de la varianza para los aislados de la especie *T.nativa*. Los valores marcados con asterisco resultaron significativos (*) $P < 0.05$.



-*T.britovi*

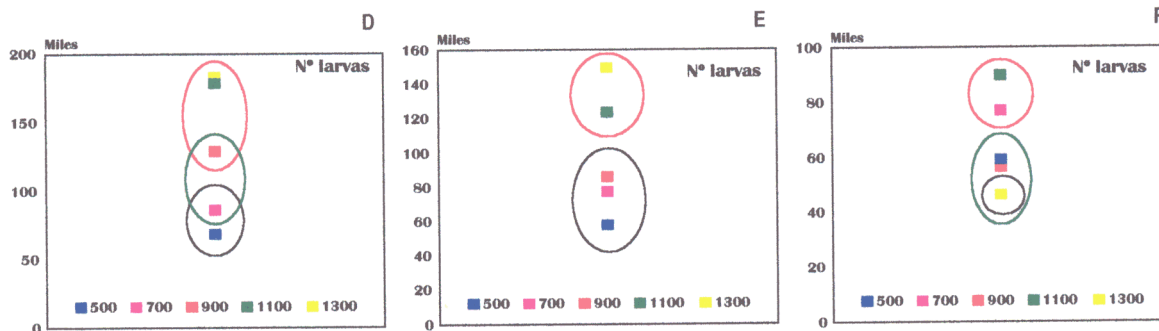
El efecto interactivo fue significativo, según se recoge en la tabla Va, es decir las tendencias mostradas por los tres aislados fueron estadísticamente distintas. Se realizaron, a continuación, los correspondientes estudios univariantes para cada uno de los aislados, de forma que los resultados correspondientes a los P-valores de dicho análisis se indican en la tabla Vb. En esta tabla podemos observar que todos los aislados presentaban P-valores estadísticamente significativos, por lo que en las gráficas siguientes se recogen las representaciones correspondientes a los test de Duncan, para cada aislado en función de la dosis (D para C-76 ; E para Monegrillo y F para Italia). Hemos de señalar además que el test de Duncan aplicado al factor aislado muestra que los tres son diferentes a nivel estadístico.

Factor	Nº larvas
Aislado	0.0001*
Dosis	0.0001*
Aislado/dosis	0.0001*

Tabla Va. Resultados de los P-valores del análisis bifactorial de la varianza para los aislados de la especie *T.britovi* (Italia, C-76 y Monegrillo). Los valores marcados con asterisco resultaron significativos (*) $P < 0.05$

Variable	T3 C-76	T3 Monegrillo	T3 Italia
Nº larvas	0.0001*	0.0001*	0.0094*

Tabla Vb. Resultados de los P-valores del análisis unifactorial de la varianza para los aislados de la especie *T.britovi*. Los valores marcados con asterisco resultaron significativos (*) $P < 0.05$.



- T6

En el caso de los dos aislados de T6 el efecto interactivo no fue significativo, según se recoge en la tabla VI. Al analizar los dos factores aislado y dosis por separado, el test tampoco encontraba diferencias significativas.

Factor	Nº larvas
Aislado	0.3951
Dosis	0.2366
Aislado/dosis	0.9916

Tabla VI. Resultados de los P-valores del análisis bifactorial de la varianza para los aislados de la especie T6 (*F.concolor* y *U.arctos*). Los valores marcados con asterisco resultaron significativos (*) $P < 0.05$.

- *T.nelsoni*

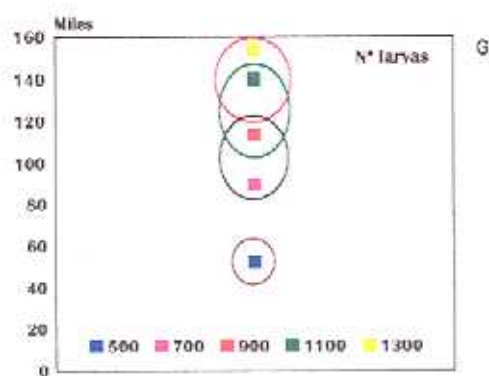
Para los dos aislados analizados, tal y como se puede observar en la tabla VIIa, se produce efecto interactivo, por ello se realizaron los correspondientes análisis unifactoriales cuyos resultados se recogen en la tabla VIIb, comprobándose que solo el aislado Kenia se veía afectado por el efecto de la dosis, recogiendo los resultados del test de Duncan en la gráfica G. Además, el efecto del factor aislado fue significativo, es decir ambos aislados eran estadísticamente diferentes.

Factor	Nº larvas
Aislado	0.0001*
Dosis	0.0001*
Aislado/dosis	0.0002*

Tabla VIIa. Resultados de los P-valores del análisis bifactorial de la varianza para los aislados de la especie *T.nelsoni* (Kenia y Tanzania). Los valores marcados con asterisco resultaron significativos (*) $P < 0.05$

Variable	T7 Kenia	T7 Tanzania
Nº larvas	0.0001*	0.5379

Tabla VIIb. Resultados de los P-valores del análisis unifactorial de la varianza para los aislados de la especie *T.nelsoni*. Los valores marcados con asterisco resultaron significativos (*) $P < 0.05$.

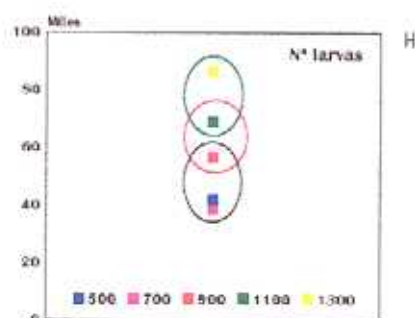


- T8

Finalmente, en el caso de la especie T8 de la que solo disponíamos de un aislado, se realizó únicamente un estudio del efecto de la dosis sobre la variable “número de larvas”, dando un valor significativo, como se indica en la tabla VIII. Los resultados del test de Duncan correspondiente se indican en la gráfica H.

Factor	Nº larvas
Dosis	0.0001*

Tabla VIII. Resultados de los P-valores del análisis de la varianza para el aislado de la especie T8 (*P.leo*). Los valores marcados con asterisco resultaron significativos (*) $P < 0.05$



10.1.5.2. SOBRE LA VARIABLE ICR

Como se ha indicado anteriormente, el ICR es un parámetro que se considera constante para cada aislado en un hospedador determinado. Para verificar esta hipótesis y comprobar que no se veía afectado por el número de larvas administradas, llevamos a cabo un estudio individual sobre cada uno de los aislados, realizándose un análisis de la varianza unifactorial sobre el factor dosis.

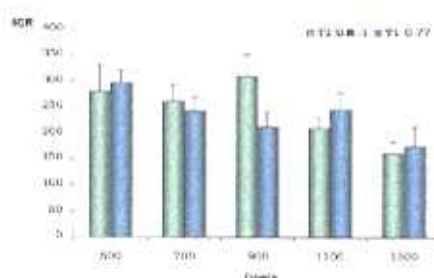
En las tablas IX a XIV se recogen los resultados de los P-valores obtenidos tras los análisis correspondientes de la varianza unifactorial, siendo significativos los que cumplían que $P < 0.05$. En las gráficas de barras se resumen los resultados de los ICR correspondientes, expresados como la media aritmética y el error estándar.

- *T. spiralis*

Para los aislados de *T. spiralis* se observa que en el caso de GM-1 el test sí fue significativo, es decir no se cumplía la hipótesis de partida.

Factor	T1 GM-1	T1-C77
Dosis	0.0313*	0.0653

Tabla IX. Resultados de los P-valores del análisis unifactorial de la varianza para los aislados de la especie *T. spiralis*. Los valores marcados con asterisco resultaron significativos (*) $P < 0.05$

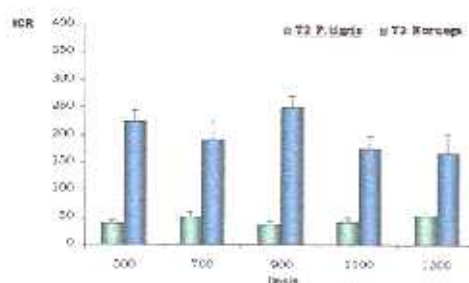


- *T. nativa*

En este caso, el test no encontraba diferencias significativas entre los ICR de las distintas dosis, para ninguno de los dos aislados estudiados.

Factor	T2 <i>P. tigris</i>	T2 Noruega
Dosis	0.4249	0.2096

Tabla X. Resultados de los P-valores del análisis unifactorial de la varianza para los aislados de la especie *T. nativa*. Los valores marcados con asterisco resultaron significativos (*) $P < 0.05$

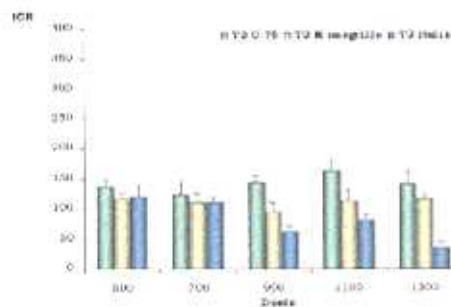


- *T.britovi*

Para *T.britovi*, solo el aislado Italia se veía afectado por el efecto de la dosis, al mostrar un P-valor estadísticamente significativo.

Factor	T3 C-76	T3 Moneg	T3 Italia
Dosis	0.7063	0.8364	0.0001*

Tabla XI. Resultados de los P-valores del análisis unifactorial de la varianza para los aislados de la especie *T.britovi*. Los valores marcados con asterisco resultaron significativos (*) $P < 0.05$.

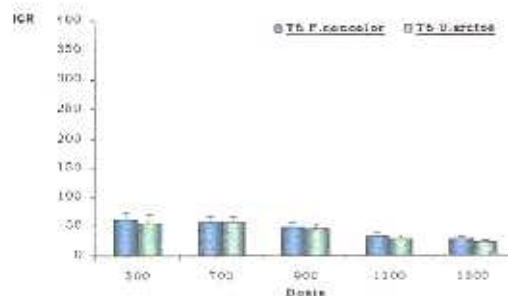


- T6

De los dos aislados de T6 solo el aislado T6 *U.arctos*, mostraba un valor estadísticamente significativo, según se recoge en la tabla adjunta,

Factor	T6 <i>F.concolor</i>	T6 <i>U.arctos</i>
Dosis	0.0528	0.0335*

Tabla XII. Resultados de los P-valores del análisis unifactorial de la varianza para los aislados de la especie T6. Los valores marcados con asterisco resultaron significativos (*) $P < 0.05$.

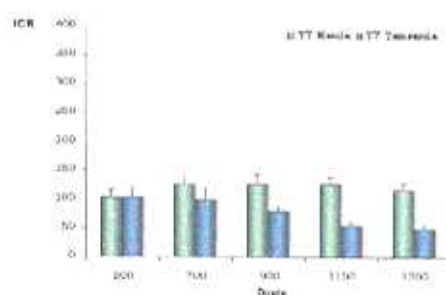


- *T. nelsoni*

Los resultados para los aislados de *T. nelsoni* muestran también un comportamiento diferente, de forma que el análisis de la varianza solo fue significativo para el aislado Tanzania, según se recoge en la tabla XIII.

Factor	T7 Kenia	T7 Tanzania
Dosis	0.6993	0.0066*

Tabla XIII. Resultados de los P-valores del análisis unifactorial de la varianza para los aislados de la especie *T. nelsoni*. Los valores marcados con asterisco resultaron significativos (*) $P < 0.05$.

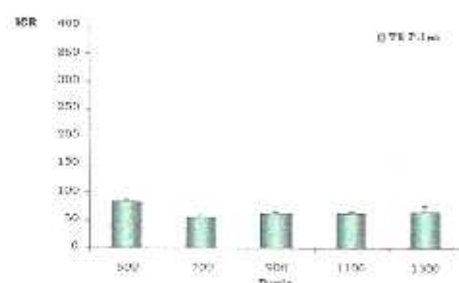


- T8

El único aislado de T8 se mostró significativamente estadístico según se recoge en la tabla correspondiente.

Factor	T8 P.leo
Dosis	0.0459*

Tabla XIV. Resultados de los P-valores del análisis unifactorial de la varianza para los aislados de la especie T8. Los valores marcados con asterisco resultaron significativos (*) $P < 0.05$.



10.2. DETERMINACIÓN DEL COMPORTAMIENTO INTESTINAL EN EL RATÓN

Este estudio se llevó a cabo sobre los aislados indicados en el apartado 10.1.1., excepto T2 Noruega, procediéndose a la determinación del nivel de asentamiento intestinal, evolución de la fase intestinal y distribución de los adultos.

10.2.1. RECUPERACIÓN Y RECUENTO DE ADULTOS.

Se siguió la técnica descrita por Denham & Martínez Fernández (1970). Los animales de experimentación infestados previamente según el procedimiento descrito en el apartado anterior, fueron sacrificados por dislocación cervical. La piel fué retirada mediante corte ventral transversal y tracción de los colgajos en sentido contrario, abriéndose a continuación la cavidad peritoneal, y extrayendo el intestino delgado, el cual con ayuda de pinzas y tijeras, se abrió longitudinalmente, colocándose sobre una gasa, sumergiéndose el conjunto, a continuación, en solución salina dentro de un bote de plástico.

Los botes eran posteriormente introducidos en una estufa a 37°C durante 2 horas, con el fin de provocar la autólisis de la mucosa intestinal y la consecuente liberación de los gusanos adultos. Transcurrido este tiempo, se retiraba la gasa con los restos de la mucosa intestinal, y tras dejar sedimentar los vermes durante 30 minutos, se eliminaba parte del líquido, para a continuación proceder al recuento de los gusanos adultos. Con el fin de facilitar una mejor visualización de los gusanos, se añadían unas gotas de tintura de iodo, de forma que finalmente se transfería la totalidad del líquido a una placa Petri reticulada, llevándose a cabo el recuento de todos los vermes

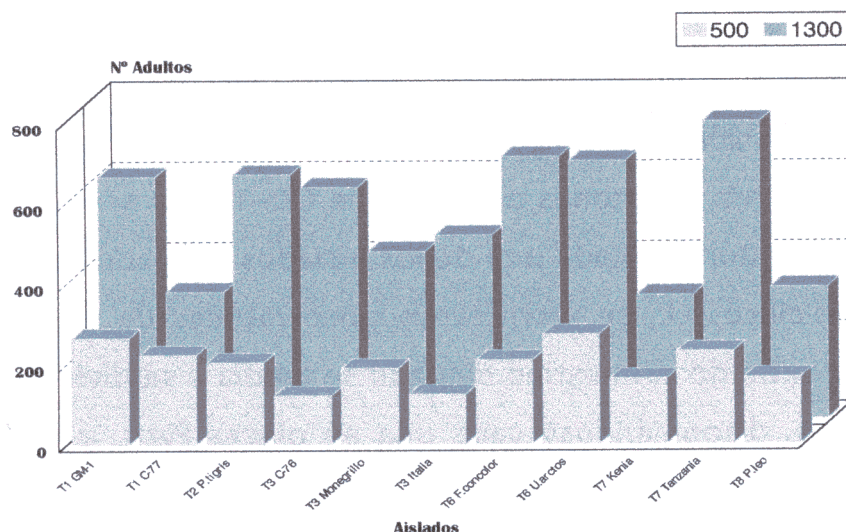
liberados de la mucosa. Realizándose dicho recuento con la ayuda de una lupa binocular Pzo Waarszawa a 1x.

10.2.2. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE ASENTAMIENTO INTESTINAL

El asentamiento intestinal es un parámetro biológico que se puede definir como el número o el porcentaje de larvas de *Trichinella* que logran instalarse en el intestino del hospedador y alcanzar en él la madurez sexual. Para estudiar el nivel de asentamiento se procedió a la infestación por vía oral de dos lotes de ratones de la estirpe CD-1 para cada uno de los aislados ya indicados, con dos dosis : 500 y 1300 larvas/ratón. A día cinco p.i. se sacrificaron cinco ratones de cada lote y se determinó el número de gusanos adultos, según se indica en el apartado anterior, quedando reflejados los resultados en la tabla XV.

Tabla XV. Nivel de asentamiento intestinal de los aislados de *Trichinella* para las dosis ensayadas, expresado como $\bar{X} \pm E.S.$ y como el porcentaje respecto a la dosis inicial.

AISLADOS	DOSIS 500		DOSIS 1300	
	$\bar{X} \pm E.S.$	(%)	$\bar{X} \pm E.S.$	(%)
T1 GM-1	263,75 \pm 47,62	52,75	603,40 \pm 39,51	46,41
T1 C-77	221,40 \pm 29,06	44,28	317,40 \pm 77,72	24,41
T2 <i>P.tigris</i>	202,25 \pm 47,27	40,45	609,20 \pm 49,37	46,86
T3 C-76	120,20 \pm 11,86	24,04	577,00 \pm 120,02	44,38
T3 Monegrillo	187,60 \pm 41,68	37,52	417,60 \pm 35,52	32,12
T3 Italia	123,20 \pm 32,26	24,64	458,50 \pm 138,96	35,27
T6 <i>F.concolor</i>	208,20 \pm 21,96	41,64	652,80 \pm 79,37	50,21
T6 <i>U.arctos</i>	271,60 \pm 23,07	54,32	642,00 \pm 48,21	49,38
T7 Kenia	161,00 \pm 20,88	32,20	308,75 \pm 95,08	23,75
T7 Tanzania	229,00 \pm 38,82	45,80	739,20 \pm 59,69	56,86
T8 <i>P.leo</i>	164,60 \pm 26,36	32,92	327,40 \pm 42,47	25,18



Gráfica 1. Comparación del asentamiento intestinal de los distintos aislados de *Trichinella* tras la administración de las dos dosis ensayadas (500 y 1300 larvas por vía oral).

10.2.2.1. ESTUDIO ESTADÍSTICO.

Nuevamente se empleó el análisis bifactorial de la varianza (aislado/dosis), para comprobar si los aislados de una misma especie mostraban la misma tendencia respecto a este parámetro y si dicha tendencia se veía afectada por efecto de la dosis. A continuación, en la tabla XVI, se indican los P-valores obtenidos tras el estudio estadístico, de forma que aquellos marcados con un asterisco (*) resultaron significativos con un nivel de significación $P < 0.05$.

Tabla XVI. P-valores obtenidos en el análisis bifactorial de la varianza para los factores aislado, dosis y el efecto interactivo (aislado/dosis) en las especies de *Trichinella* estudiadas.

Factor	<i>T.spirali</i>	<i>T.nativa</i>	<i>T.britovi</i>	<i>T6</i>	<i>T.nelson</i>	<i>T8</i>
Aislado	0.0071*	—	0.6908	0.5995	0.0007*	—
Dosis	0.0090*	0.0006*	0.0001*	0.0001*	0.0001*	0.0116*
Aislado/dosis	0.0355*	—	0.2765	0.4608	0.0072*	—

Aquellos valores marcados con un asterisco (*) resultaron significativos con un nivel de significación $P < 0.05$.

10.2.3. DISTRIBUCIÓN INTESTINAL

Para estudiar la distribución intestinal se procedió a la infestación por vía oral, de dos grupos de lotes de ratones de la estirpe CD-1, con sendas dosis de 500 y 1300 larvas/ratón, de cada uno de los aislados indicados en el apartado 10.1.1. A día cinco p.i., se sacrificaron cinco ratones de cada uno de los lotes. Una vez extraído el intestino delgado se medía y se dividía en cinco porciones iguales, disponiéndose cada una en placas Petri, y se dejaba en incubación a 37°C, durante dos horas en solución salina, procediéndose a continuación, al recuento de los adultos según se indica en el apartado 10.2.1. Los resultados obtenidos se recogen en las figuras 17 y 18, calculándose para cada aislado y dosis, la media aritmética y el error estándar. Además, en las tablas XVII y XVIII se indica el porcentaje correspondiente a cada porción respecto del total de adultos asentados, para cada una de las dosis, en el día de estudio.

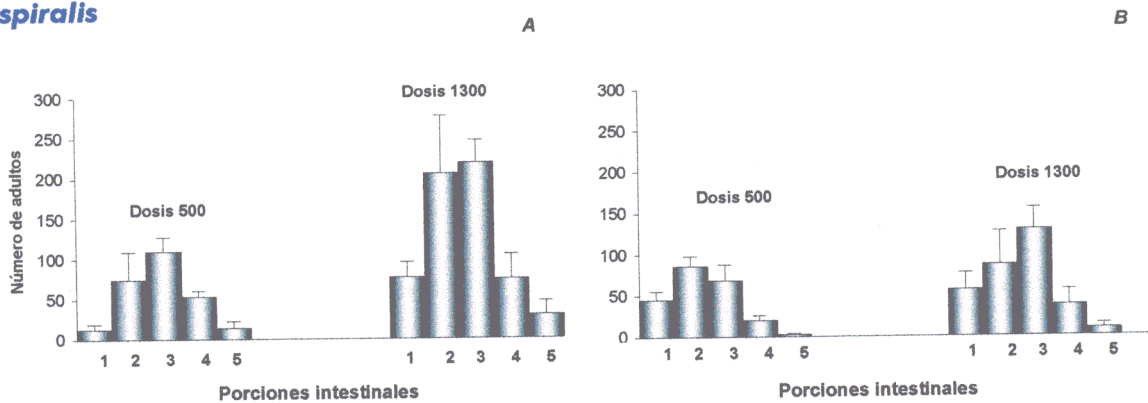
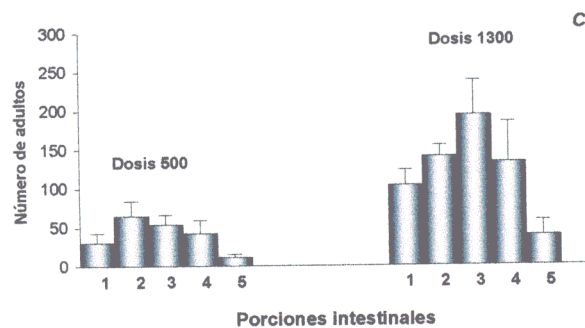
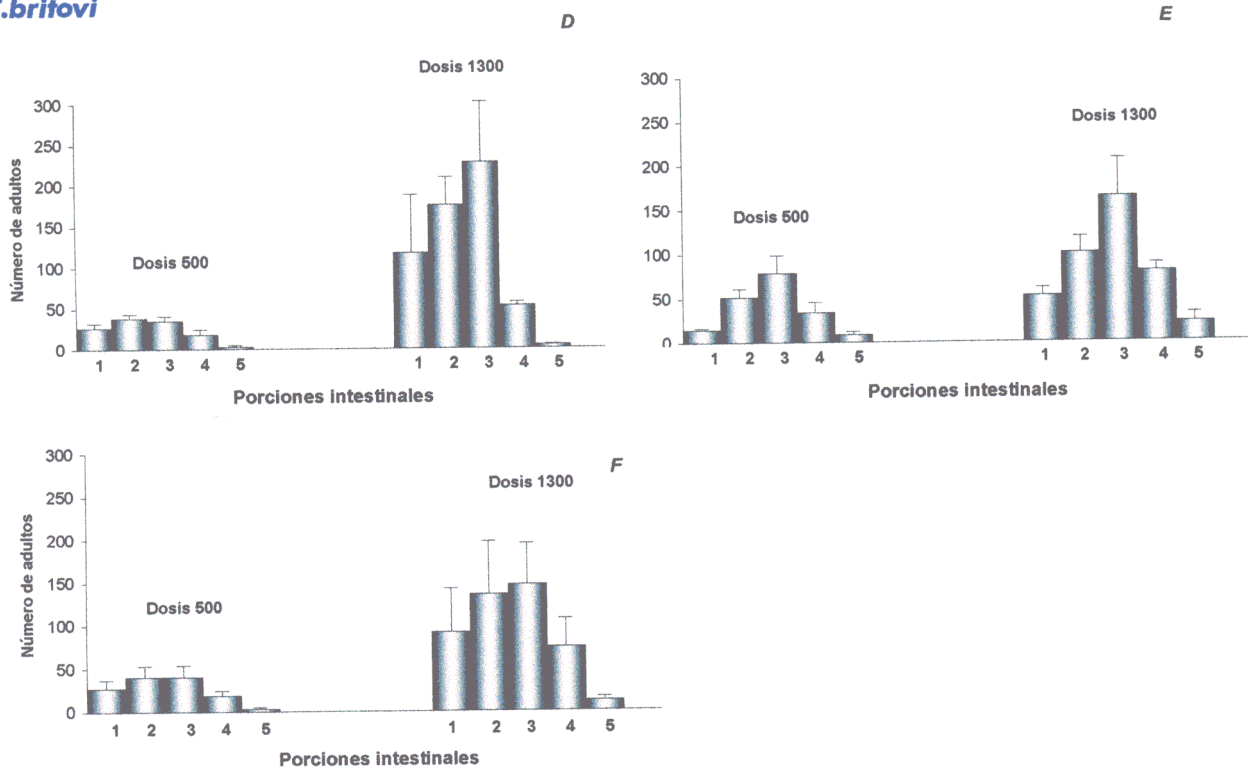
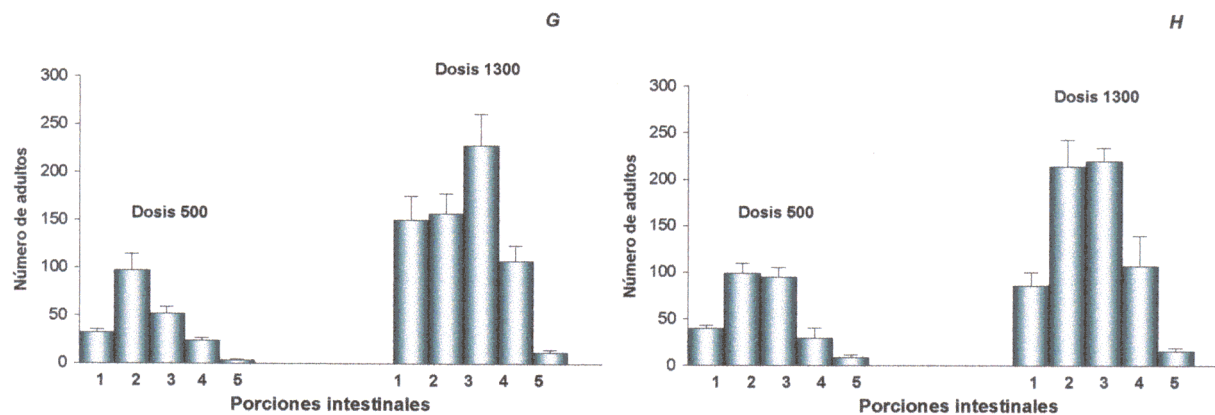
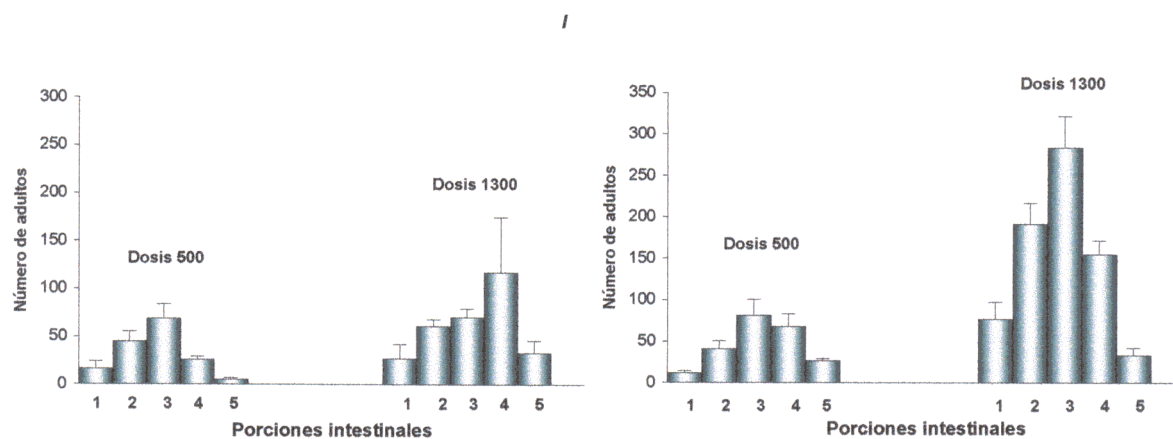
T. spiralis***T. nativa******T. britovi***

Figura 17. Distribución intestinal de los adultos recuperados a día 5 p.i., tras la infestación con dos dosificaciones, expresados como la media y el error standar para cada una de las porciones. A. T1 GM-1 ; B. T1 C-77 ; C. T2 P.tigris ; D. T3 C-76 ; E. T3 Monegrillo ; F. T3 Italia.

T6



T.nelsoni



T8

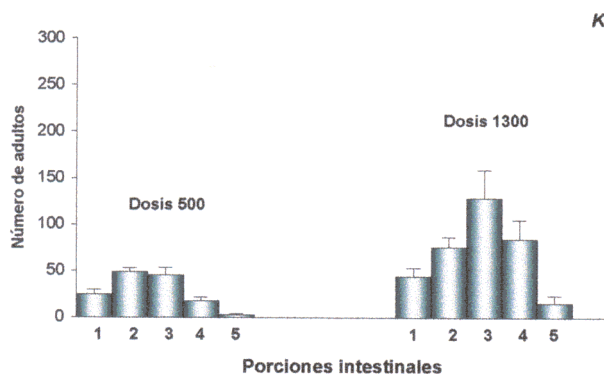


Figura 18. Distribución intestinal de los adultos recuperados a día 5 p.i., tras la infestación con dos dosificaciones, expresados como la media y el error standar para cada una de las porciones. G. T6 *F.concolor* ; H. T6 *U.arctos* ; I. T7 *Kenia* ; J. T7 *Tanzania* ; K. T8 *P.leo*.

Tabla XVII. Distribución intestinal a día 5 p.i., expresada como porcentaje respecto del total de adultos instalados en intestino para la dosis de 500 larvas.

AISLADOS	Porción 1	Porción 2	Porción 3	Porción 4	Porción 5
T1 GM-1	4,95	28,20	41,59	20,13	5,31
T1 C-77	20,50	38,66	30,89	8,94	1,00
T2 <i>P.tigris</i>	15,20	32,14	26,45	20,75	5,43
T3 C-76	21,96	31,44	29,12	14,97	2,49
T3 Monegrillo	7,78	27,40	42,11	18,23	4,47
T3 Italia	21,05	30,96	31,11	14,55	2,32
T6 <i>F.concolor</i>	15,39	46,68	24,78	11,52	1,63
T6 <i>U.arctos</i>	14,64	36,42	34,80	10,89	3,23
T7 Kenia	10,18	27,95	42,86	15,90	3,10
T7 Tanzania	5,24	17,79	35,58	29,69	11,68
T8 <i>P.leo</i>	17,65	35,02	32,56	12,59	2,17

Tabla XVIII. Distribución intestinal a día 5 p.i., expresada como porcentaje respecto del total de adultos instalados en intestino para la dosis de 1300 larvas.

AISLADOS	Porción 1	Porción 2	Porción 3	Porción 4	Porción 5
T1 GM-1	12,63	34,01	36,20	12,27	4,87
T1 C-77	17,58	27,16	40,64	11,72	2,89
T2 <i>P.tigris</i>	16,97	23,08	31,74	21,79	6,40
T3 C-76	20,32	30,41	39,47	9,09	0,69
T3 Monegrillo	12,45	24,09	39,22	18,96	5,27
T3 Italia	19,84	29,55	31,95	16,14	2,51
T6 <i>F.concolor</i>	22,94	23,98	34,95	16,36	1,74
T6 <i>U.arctos</i>	13,30	33,36	34,23	16,66	2,43
T7 Kenia	8,74	19,75	22,83	37,97	10,68
T7 Tanzania	10,39	25,86	38,36	20,88	4,49
T8 <i>P.leo</i>	12,72	21,70	36,96	24,23	4,37

10.2.3.1. ESTUDIO ESTADÍSTICO

A) Para analizar si la distribución a lo largo de las porciones se mantenía en los aislados de una misma especie (en aquellas especies en que disponíamos de más de un aislado), se recurrió al análisis de la varianza bifactorial (aislado/porción) de medias repetidas sobre el factor porción. A continuación recogemos en la tabla XIX los P-valores obtenidos en la determinación del efecto interactivo, para cada una de las especies y dosis de estudio.

ESPECIES	DOSIS 500	DOSIS 1300
<i>T.spiralis</i>	0.0765	0.4932
<i>T.britovi</i>	0.0248*	0.7571
T6	0.0705	0.0634
<i>T.nelsoni</i>	0.0992	0.0006*

Tabla XIX. P-valores del efecto interactivo obtenidos en el análisis de la varianza bifactorial (aislado/porción) para las especies de *Trichinella* en estudio.

Aquellos valores marcados con un asterisco (*) resultaron significativos con un nivel de significación $P < 0.05$.

B) Para analizar la distribución a lo largo del intestino porción a porción, sobre aquellos aislados englobados dentro de una misma especie, se llevó a cabo un análisis bifactorial de la varianza (aislado/dosis), con el fin de determinar si presentaban la misma tendencia y si esta distribución además, variaba en función de la dosis infestante. A continuación, en la tabla XX, se muestran los resultados de los P-valores obtenidos para los factores aislado y dosis y para el efecto interactivo, de forma que aquellos marcados con un asterisco (*) resultaron significativos con un nivel de significación $P < 0.05$. En aquellas especies en que solo se disponía de un aislado se analizó únicamente el efecto de la dosis, quedando reflejados los resultados de los P-valores en la tabla XXI.

Tabla XX. P-valores obtenidos en el análisis bifactorial (aislado/dosis) de la varianza para cada una de las porciones, de las especies de las que se disponía de más de un aislado.

Especies	Factor	Porción 1	Porción 2	Porción 3	Porción 4	Porción 5
<i>T. spiralis</i>	Aislado	0.7074	0.2657	0.0157*	0.0997	0.1300
	Dosis	0.0386*	0.1781	0.0300*	0.3510	0.2960
	Aislado/dosis	0.1237	0.1819	0.3297	0.9293	0.6971
<i>T. britovi</i>	Aislado	0.4428	0.5012	0.5923	0.3871	0.0798
	Dosis	0.0180*	0.0002*	0.0004*	0.0017*	0.0775
	Aislado/dosis	0.6833	0.2501	0.3325	0.8059	0.4685
T6	Aislado	0.0749	0.1663	0.3783	0.8786	0.1142
	Dosis	0.0001*	0.0006*	0.0001*	0.0006*	0.0203*
	Aislado/dosis	0.0272	0.1919	0.1970	0.8869	0.8372
<i>T. nelsoni</i>	Aislado	0.1277	0.0018*	0.0005*	0.1745	0.1717
	Dosis	0.0176*	0.0002*	0.0011*	0.0064*	0.0402*
	Aislado/dosis	0.0737	0.0011*	0.0012*	0.9261	0.1791

Aquellos valores marcados con un asterisco (*) resultaron significativos con un nivel de significación $P < 0.05$.

Tabla XXI. P-valores obtenidos en el análisis unifactorial, sobre el factor dosis, de la varianza para cada una de las porciones de las especies de las que se disponía de un solo aislado.

Especies	Porción 1	Porción 2	Porción 3	Porción 4	Porción 5
<i>T. nativa</i>	0.0237*	0.0140*	0.0308*	0.1795	0.2404
T8	0.0988	0.0532	0.0292*	0.0144*	0.1665

Aquellos valores marcados con un asterisco (*) resultaron significativos con un nivel de significación $P < 0.005$.

10.2.4. DINÁMICA DE LA FASE INTESTINAL

Se procedió a la infestación de lotes de 40–50 ratones de la estirpe CD-1 con 500 larvas/ratón, para cada uno de los aislados de *Trichinella* en estudio, excepto T2 Noruega (apartado 10.1.1.). A partir de día 5 p.i. y cada 2–3 días, se sacrificaron 8–10 animales por lote. En todos los casos, se procedió a la extracción del intestino delgado, aislamiento y recuento de los adultos intestinales, siguiendo la técnica descrita en el apartado 10.2.1. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla XXII, calculándose para cada aislado y día, la media aritmética, el error estándar y el porcentaje de reducción durante el proceso de autocuración, tomando como valor de referencia el obtenido a día 5 p.i. La representación gráfica de la evolución de la población intestinal de las distintas especies aparece recogida en la figura 19.

Tabla XXII. Evolución del número de adultos asentados en el intestino de ratones infestados con 500 larvas de las distintas especies de *Trichinella*, expresado como la $\bar{X} \pm$ E.S., para cada uno de los días del estudio, indicándose en color azul el porcentaje de reducción respecto al día 5 p.i..

AISLADOS	Día 5	Día 8-9	Día 10-11	Día 12-13	Día 14-15
T1 GM-1	133,62 \pm 15,37	123,37 \pm 10,93	97,87 \pm 9,11	55,71 \pm 3,09	9,57 \pm 2,38
		7.67%	26.76%	58.31%	92.67%
T1 C-77	188,77 \pm 21,74	207,22 \pm 24,19	137,50 \pm 21,93	136,12 \pm 21,43	62,37 \pm 6,00
		0%	27.37%	27.89%	66.96%
T2 <i>P.tigris</i>	153,40 \pm 28,80	85,30 \pm 10,80	26,00 \pm 5,09	31,40 \pm 6,04	10,10 \pm 4,91
		44.29%	83.02%	79.49%	93.41%
T3 C-76	168,60 \pm 16,46	231,11 \pm 17,45	13,00 \pm 4,45	8,90 \pm 4,42	0,00 \pm 0,00
		0%	92.29%	94.72%	100%
T3 Monegrillo	122,33 \pm 15,01	120,88 \pm 23,46	121,75 \pm 23,09	91,11 \pm 12,34	37,25 \pm 8,45
		1.18%	0.52%	25.52%	69.55%
T6 <i>F.concolor</i>	172,22 \pm 12,60	174,44 \pm 16,12	84,50 \pm 11,22	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
		0%	15.5%	100%	100%
T6 <i>U.arctus</i>	181,65 \pm 26,43	113,87 \pm 10,26	134,12 \pm 11,36	108,00 \pm 11,30	36,37 \pm 9,19
		37.32%	26.17%	40.55%	79.98%
T7 Kenia	239,30 \pm 16,90	155,37 \pm 21,24	94,55 \pm 27,75	34,50 \pm 10,40	-
		35.08%	60.49%	85.59%	
T7 Tanzania	223,12 \pm 13,44	159,62 \pm 17,40	79,44 \pm 18,43	17,11 \pm 7,90	4,66 \pm 3,04
		28.46%	64.40%	92.34%	97.92%
T8 <i>P.leo</i>	262,33 \pm 33,98	187,30 \pm 15,28	136,77 \pm 18,24	8,33 \pm 2,14	7,44 \pm 2,70
		28.61%	47.87%	96.84%	97.16%

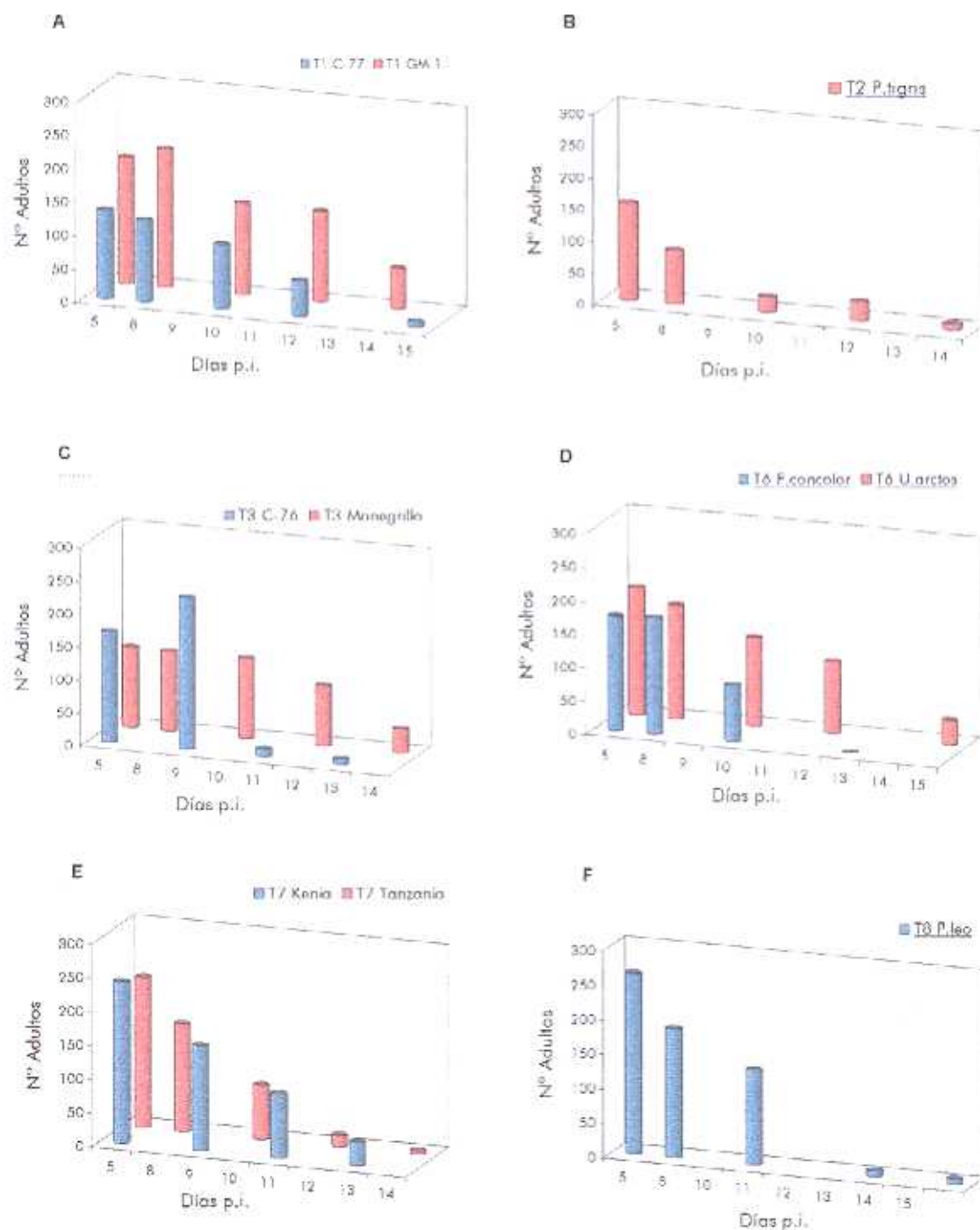


Figura 19. Representación gráfica de la dinámica de la infestación intestinal de distintas especies de *Trichinella*. A. *T. spiralis*; B. *T. nativa*; C. *T. britovi*; D. *T6*; E. *T. nelsoni*; F. *T8*.

10.3. PROLIFICIDAD Y RITMO DE LARVIPOSICIÓN *IN VITRO*

Se infestaron, por vía oral, lotes de ratones CD-1 con 500 larvas/ratón de cada uno de los aislados indicados en el apartado 10.1.1., excepto T2 Noruega. Durante los días 5, 6, 7 y 8 post-infestación se sacrificaron dos ratones de cada lote; del intestino delgado de los mismos se procedió al aislamiento de 50 hembras adultas que fueron mantenidas bajo condiciones adecuadas de cultivo, procediéndose posteriormente al recuento de los embriones depositados por cada una de ellas.

10.3.1. AISLAMIENTO E INCUBACIÓN *IN VITRO* DE LAS HEMBRAS ADULTAS

Se sacrificaron por dislocación cervical dos ratones infestados para posteriormente extraer los intestinos delgados. Estos se abrieron longitudinalmente, disponiéndose en un Baerman con solución salina, y en una estufa a 37°C y 5% de CO₂, durante 1 hora. Transcurrido este tiempo, los gusanos adultos sedimentados en el fondo del bote se recogían, tras eliminar parte del líquido sobrenadante, pasando a continuación dicho sedimento a una placa Petri, desde donde, y con ayuda de un estereomicroscopio y una pipeta Pasteur, provista de bulbo de goma, se aislaban las hembras adultas vivas, las cuales se sometían a varios procesos de lavado en solución salina estéril para eliminar restos del contenido intestinal. A continuación, se disponía una hembra en cada pocillo de una placa NUNCLON de 24 pocillos de fondo plano y reticulada, que contenía 2 ml de solución de Hanks con 1% de Mínimo Medio Esencial Sigma, suplementado con glutamina 2 mM, Hepes 10 mM, y antibióticos (penicilina, 50 unidades/ml y estreptomicina, 50 µg/ml), a pH 7,4, esterilizado por filtración. Las hembras así dispuestas se incubaban en el medio de cultivo durante 24 h a 37°C y 5% de CO₂.

10.3.2. RECuento DE EMBRIONES.

El recuento se efectuaba en cada pocillo de la placa reticulada, utilizando un microscopio invertido Olympus MI, calculándose a continuación la media y el error estándar, para cada uno de los días de estudio y el porcentaje correspondiente a cada día, sobre el valor acumulado.

10.3.3. DETERMINACIÓN DEL RITMO DE LARVIPOSICIÓN *IN VITRO*

Se pretendía en este estudio comprobar si los aislados que previamente habían sido agrupados dentro de una misma especie por otras técnicas presentaban un comportamiento semejante en el ritmo de larviposición, ya que este parámetro también ha sido considerado por varios autores como constante y predecible para cada aislado (Belosevic & Dick, 1979 ; Dick & Chadee, 1981).

A continuación se representan dos tipos de gráficas, las de líneas indican el ritmo de larviposición para los días de estudio, expresado como la media aritmética y el error estándar para cada uno de los aislados y las de sectores, representan el porcentaje correspondiente a cada día, sobre el valor total del número de embriones recogidos durante los días de estudio, valor que a su vez, aparece indicado en el centro de las mismas y en negrita.

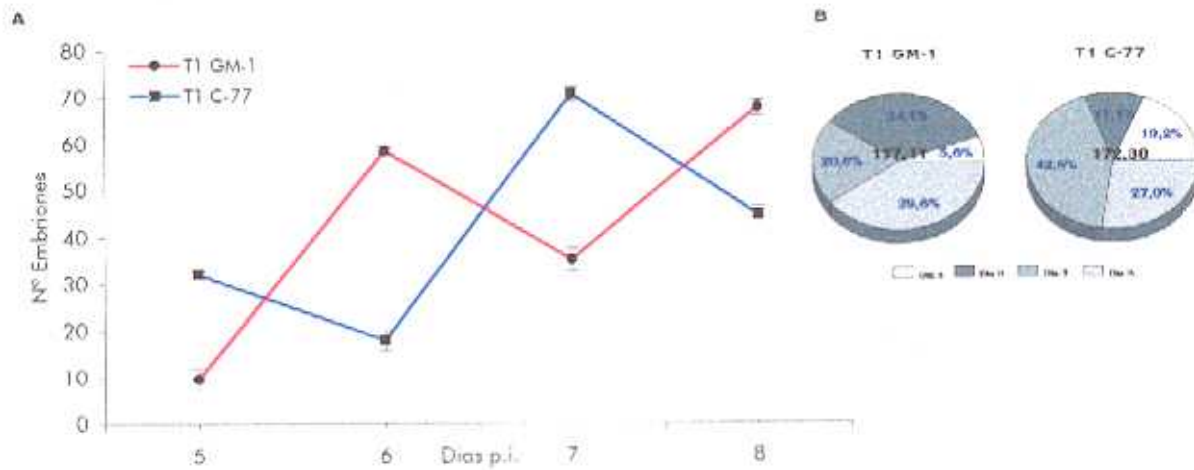


Figura 20. A. Ritmo de larviposición "in vitro" de las hembras adultas de los aislados de la especie *T. spiralis*. B. Porcentaje correspondiente a cada día del estudio sobre el valor acumulado para cada uno de los aislados.

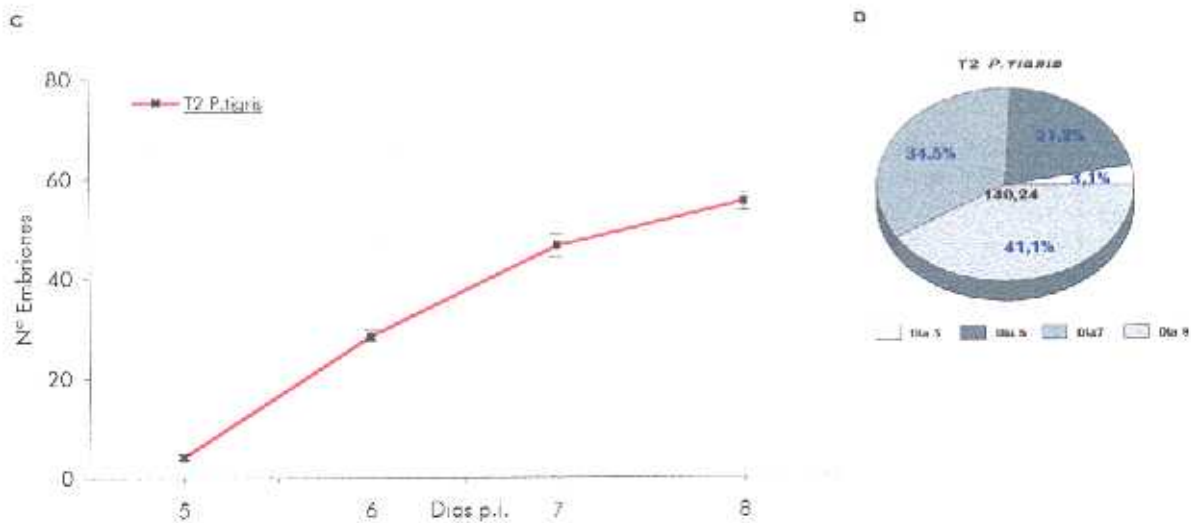


Figura 21. C. Ritmo de larviposición "in vitro" de las hembras adultas del aislado de la especie *T. nativa*. D. Porcentaje correspondiente a cada día del estudio sobre el valor acumulado.

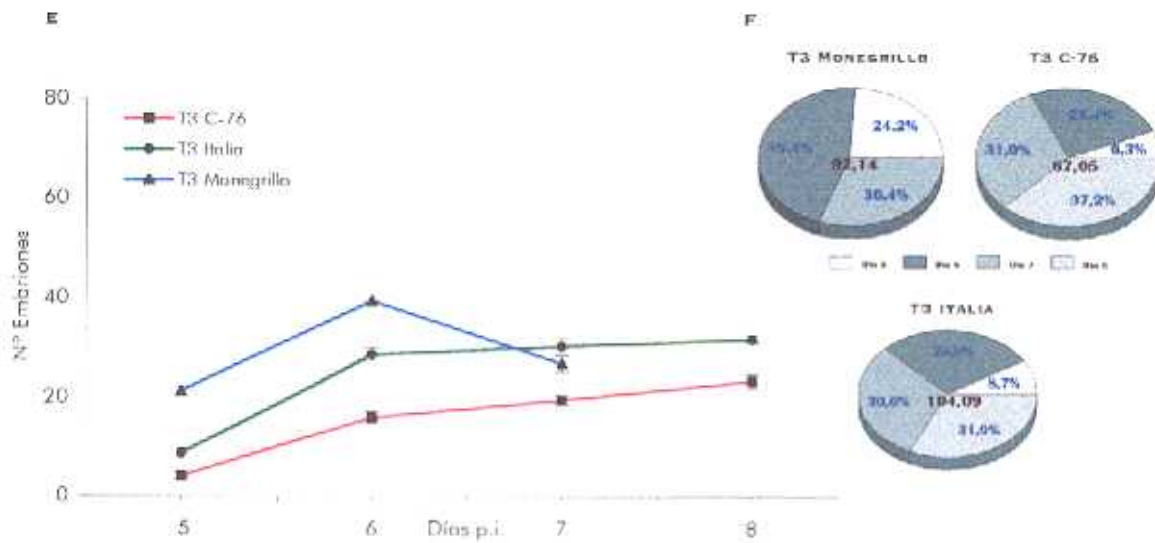


Figura 22. E. Ritmo de larviposición "in vitro" de las hembras adultas de los aislados de la especie *T. britovi*. F. Porcentaje correspondiente a cada día del estudio sobre el valor acumulado para cada uno de los aislados.

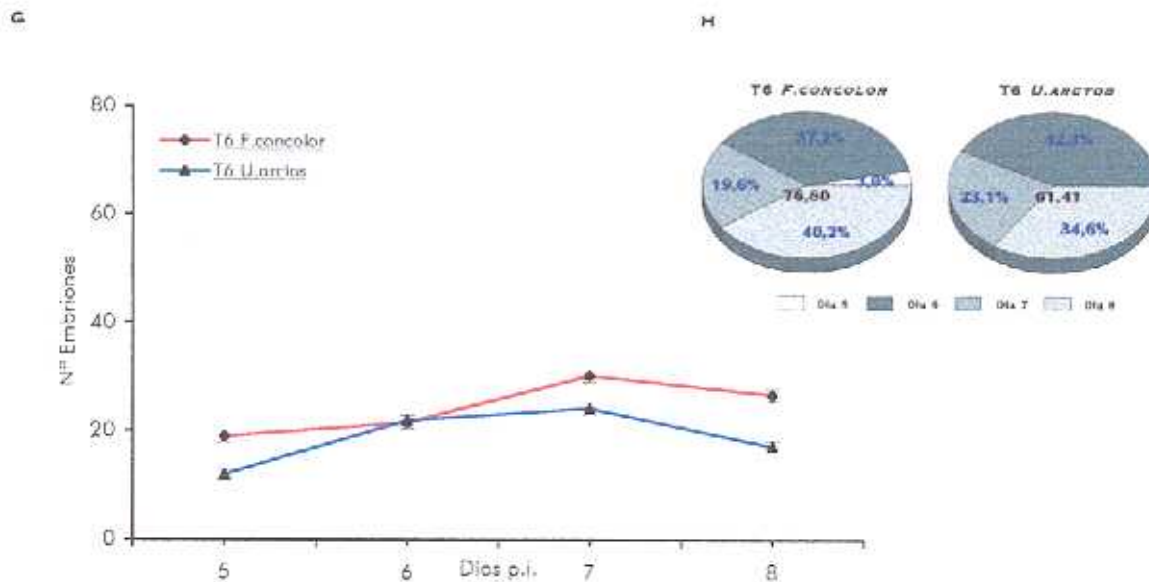


Figura 23. G. Ritmo de larviposición "in vitro" de las hembras adultas de los aislados de la especie *T6*. H. Porcentaje correspondiente a cada día del estudio sobre el valor acumulado para cada uno de los aislados.

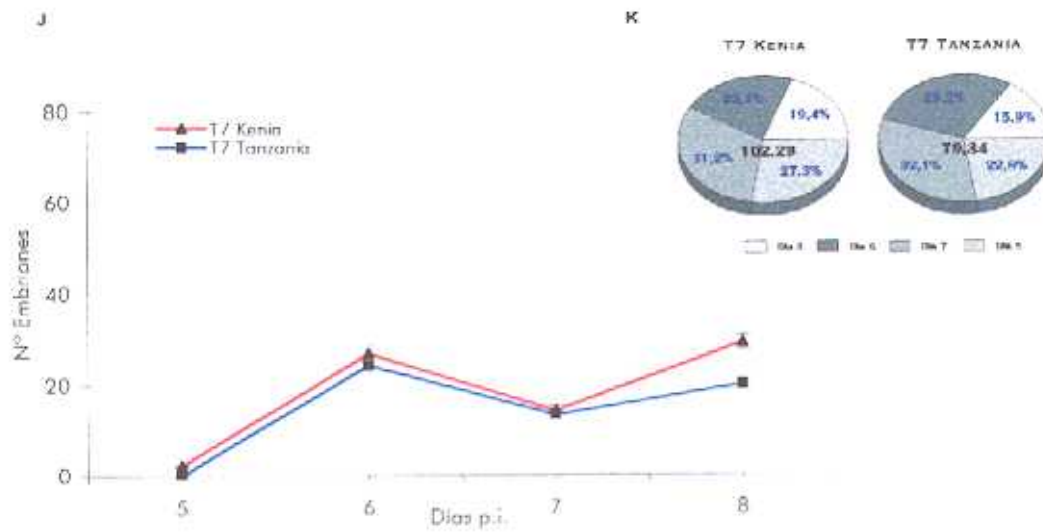


Figura 24. J. Ritmo de larviposición "in vitro" de las hembras adultas del aislado de la especie *T. nelsoni*. K. Porcentaje correspondiente a cada día del estudio sobre el valor acumulado para cada uno de los aislados.

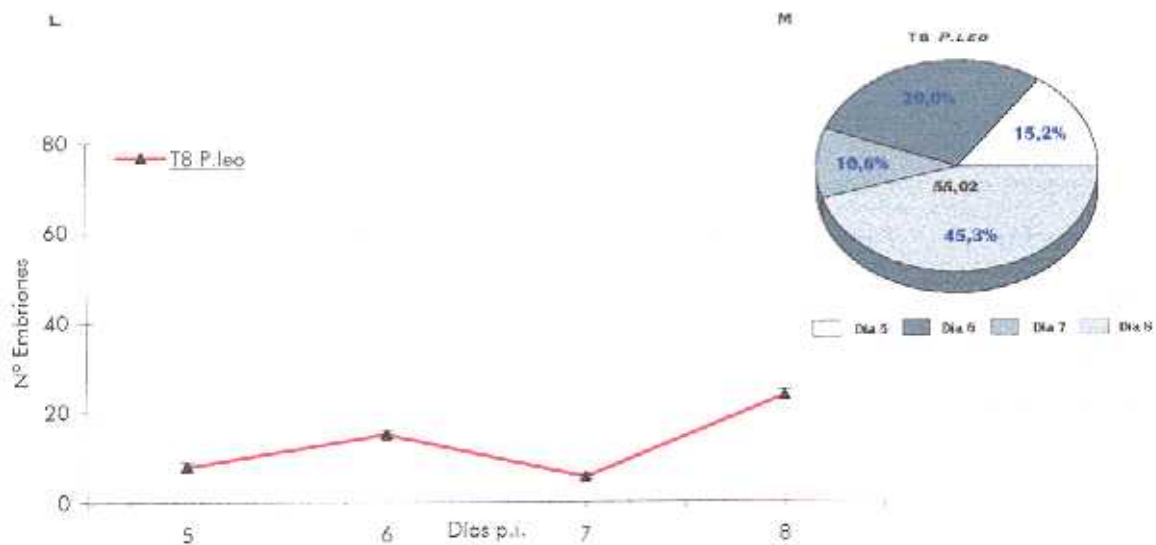


Figura 25. L. Ritmo de larviposición "in vitro" de las hembras adultas de los aislados de la especie *T8*. M. Porcentaje correspondiente a cada día del estudio sobre el valor acumulado.

10.3.3.1. ESTUDIO ESTADÍSTICO

Para el estudio estadístico se recurrió, como en los apartados anteriores al análisis de la varianza bifactorial (en este caso tiempo/aislado), sobre la variable “número de embriones recogidos”, y de igual forma en aquellos casos en que el efecto interactivo fué significativo ($P < 0.05$), se realizó un análisis unifactorial de la varianza sobre el factor tiempo para cada aislado, y nuevamente si éste resultaba significativo ($P < 0.05$), se aplicaba finalmente el test de comparaciones múltiples de Duncan. A continuación, en las tablas XXIII y XXIV, se indican los resultados de los P-valores obtenidos en dichos análisis y las agrupaciones proporcionadas por el test de Duncan, de forma que en este último caso, los días que quedaban englobados dentro del mismo grupo, por no presentar diferencias significativamente estadísticas, fueron subrayados con una línea roja.

Tabla XXIII. P-valores obtenidos tras el análisis bifactorial de la varianza para cada una de las especies de *Trichinella*.

Factor	<i>T.spiralis</i>	<i>T.nativa</i>	<i>T.britovi</i>	T6	<i>T.nelsoni</i>	T8
Aislado	0.2763	–	0.0001*	0.0001*	0.0001*	–
Tiempo	0.0001*	0.0001*	0.0001*	0.0001*	0.0001*	0.0001*
Aislado/tiempo	0.0001*	–	0.0001*	0.0041*	0.0001*	–

Aquellos valores marcados con un asterisco (*) resultaron significativos con un nivel de significación $P < 0.05$

Tabla XXIV. P-valores obtenidos en el análisis unifactorial de la varianza para cada aislado y resultados del test de Duncan.

Aislados	Análisis varianza unifactorial	Test de Duncan
T1 GM-1	0.0001*	5 6 7 8
T1 C-77	0.0001*	5 6 7 8
T2 <i>P.tigris</i>	0.0001*	5 6 7 8
T3 C-76	0.0001*	5 6 7 8
T3 Monegrillo	0.0001*	6 7 8
T3 Italia	0.0001*	5 <u>6 7 8</u>
T6 <i>F.concolor</i>	0.0001*	5 <u>6</u> 7 <u>8</u>
T6 <i>U.arctos</i>	0.0001*	5 6 7 8
T7 Kenia	0.0001*	<u>5 6</u> 7 8
T7 Tanzania	0.0001*	5 <u>6 7</u> 8
T8 <i>P.leo</i>	0.0001*	<u>5</u> <u>6</u> <u>7</u> 8

Aquellos valores marcados con un asterisco (*) resultaron significativos con un nivel de significación $P < 0.05$

ABRIR MÉTODOS Y RESULTADOS II

